

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra zoologie  
Studijní program: Biologie  
Studijní obor: NZOO



**Bc. Lucie Obstová**

**Role kaudálního orgánu v chemické komunikaci myšic rodu *Apodemus***

The role of caudal organ in chemical communication in field mice of the genus *Apodemus*

Diplomová práce  
Praha 2014

Vedoucí práce: doc. Mgr. Pavel Stopka Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 11.8.2014

Podpis

### **Poděkování**

**Na prvním místě bych chtěla poděkovat své rodině za velkou podporu během studia.**

Velké poděkování patří mému školiteli docentu Pavlu Stopkovi za cenné rady ohledně výzkumu, za zajištění experimentů a za vedení během magisterského studia.

Poděkování patří i Romaně Stopkové, Davidu Vinklerovi, Janu Suchanovi, Heleně Uhlířové, Lence Bulvové a Lídě Pospíšilové. Každý z nich mi svými zkušenostmi pomohl ke vzniku této diplomové práce.

Speciálně bych chtěla poděkovat Petru Klemptovi, který mi byl trpělivým učitelem v laboratoři, konzultantem, pomocníkem, rádce i velkou oporou.

V poděkování bych nechtěla zapomenout na svůj oblíbený studentský klub Mrtvá Ryba, protože nejlepší nápady přicházely právě tam.

## Obsah

<b>Abstrakt .....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>Cíle diplomové práce .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Chemická komunikace.....</b>	<b>9</b>
1.1. Význam chemické komunikace u myšic rodu <i>Apodemus</i> .....	9
1.2. Signalizační látky .....	9
1.3. Vomeronazální orgán .....	10
1.4. První objevy signalizačních molekul (odorantů, feromonů) .....	11
1.5. Biologická aktivita signalizačních molekul .....	11
<b>2. Zdroje signalizačních molekul .....</b>	<b>12</b>
2.1. Molekuly přítomné v moči a jejich souvislost s chemickou komunikací.....	12
2.1.1. Efekty močových značek.....	14
2.2. Mazové žlázy .....	15
2.2.1. Žlázy čeledi Muridae .....	17
<b>3. Kaudální orgán .....</b>	<b>18</b>
3.1. Sekret kaudálního orgánu a informace v něm uložené.....	19
3.2. Kaudální žláza pytlouše rodu <i>Perognathus</i> .....	21
<b>4. Metodika .....</b>	<b>22</b>
4.1. Pracovní podmínky .....	22
4.2. Pracovní materiál .....	22
4.3. Transkriptomová část.....	22
4.3.1. Izolace RNA .....	23
4.3.2. Kontrola kvality a měření koncentrace RNA .....	23
4.3.3. Reverzní transkripce .....	24
4.3.4. cDNA amplifikace.....	24
4.3.5. Příprava cDNA knihovny .....	26
4.3.6. Zpracování výsledků a databáze.....	26
4.4. Proteomická analýza .....	26
4.4.1. NuPAGE® Novex Midi gel.....	27
4.4.2. Barvení gelu pomocí Coomassie G-250 .....	28
4.4.3. LC-MS/MS analýza .....	29
4.5. Relativní kvantifikace exprese vybraných genů na hladině mRNA .....	30
4.5.1. Složky qPCR.....	31

4.5.2.	Izolace RNA a přepis do cDNA .....	32
4.5.3.	Zpracování výsledků .....	33
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>34</b>
5.1.	<i>Transkriptomová část</i> .....	34
5.2.	<i>Proteomická analýza</i> .....	36
5.2.1.	1-D elektroforéza .....	37
5.2.2.	Výsledky analýzy hmotnostního spektrometru .....	37
5.2.3.	Lipokality kaudálního orgánu.....	37
5.2.4.	Abundantní proteiny sekretu .....	38
5.3.	<i>Ověření exprese pomocí qPCR</i> .....	39
5.3.1.	mRNA abundance závislá na pohlaví.....	40
<b>Diskuze</b>	.....	<b>42</b>
<b>Závěr</b>	.....	<b>46</b>
<b>Literatura</b>	.....	<b>47</b>
<b>Přílohy</b>		

## **Abstrakt**

Tato práce se zabývá chemickou komunikací myšic rodu *Apodemus* se zaměřením na kaudální orgán - speciální mazovou žlázu na ventrální straně ocasu. Role kaudálního orgánu v chemické komunikaci je nejasná. K osvětlení funkce této mazové žlázy jsem se rozhodla využít metod 454 pyrosekvenování, proteomické analýzy a qPCR. Pomocí 454 pyrosekvenování jsem získala databázi transkripčně aktivních genů kaudálního orgánu. V proteomické analýze jsem se zaměřila na proteiny o molekulové hmotnosti 14-18kDa k ověření přítomnosti tzv. lipokalinů, proteinů účastnících se chemické komunikace. Pomocí qPCR jsem porovnávala relativní mRNA abundanci vybraných genů mezi jedinci opačného pohlaví. Provedeným výzkumem jsem zjistila, že je kaudální orgán aktivním orgánem a chemické komunikace by se mohl účastnit. Na úrovni mRNA jsem detekovala odlišné relativní mRNA abundance genů u samců a samic, které by mohly hrát roli v rozdílech vývinu kaudálního orgánu mezi jedinci opačného pohlaví. Ze získaných výsledků jsem nakonec navrhla možné způsoby využití kaudálního orgánu v chemické komunikaci myšic rodu *Apodemus*.

Klíčová slova: kaudální orgán, *Apodemus*, chemická komunikace, FABP5, Scd1

## **Abstract**

This thesis deals with the chemical communication of wood mouse of genus *Apodemus* with a focus on the special sebaceous gland on the ventral side of the tail - the caudal organ. Role of the caudal organ in chemical communication is unclear. To illustrate the function of the sebaceous glands, I decided to use methods of 454 pyrosequencing, proteomic analysis and qPCR. I created a database of transcriptionally active genes of caudal organ using 454 pyrosequencing. In proteomic analysis, I focused on proteins with a molecular weight 14-18kDa to verify the presence of the lipocalins, proteins involved in chemical communication. I compared the relative mRNA abundance of selected genes between individuals of the opposite sex using qPCR. In my research, I found that the caudal organ is active organ and caudal organ could participate in chemical communication. I detected a different relative mRNA abundance of genes in males and females at the mRNA level, which could play a role in differences in development of caudal organ between individuals of the opposite sex. Finally, I suggested possible ways of using the caudal organ in the chemical communication in wood mouse genus *Apodemus* from the obtained results.

Key words: caudal organ, *Apodemus*, chemical communication, FABP5, Scd1

## **Úvod**

Chemická komunikace je pro organismy životně důležitá. Detekovat nebezpečí je stejně klíčové jako detekovat samici v době rozmnožování. Nejlépe prozkoumanou oblastí chemické komunikace u hlodavců představují pachové značky myši (*Mus*) z čeledi *Muridae*. Tito hlodavci spolu komunikují pomocí proteinů obsažených v moči, tzv. hlavních močových proteinů („major urinary protein“, MUPs). Jejich hlavní rolí je vazba, ochrana a transport feromonů z jater přes ledviny do moči (Stopka, Janotová & Heyrovský, 2007). Po vystavení močové značky prodlouží MUPy signál feromonu postupným uvolňováním do prostředí (Hurst et al. 1998). Myšice rodu *Apodemus* ze stejné čeledi nemají tyto proteiny v moči obsaženy v takovém množství, aby se mohly účastnit chemické komunikace. Jak spolu tedy komunikují myšice? Kandidátním orgánem se zdá být speciální mazová žláza na ventrální straně ocasu, tzv. kaudální orgán (Niethammer, 1969; Stoddart, 1971). Z tohoto orgánu je na povrch ocasu kolem vlasových folikulů vylučován sekret mléčné barvy (Stoddart, 1971), který je druhově, věkově, pohlavně a populačně specifický (Stoddart & Sales, 1985). Předpokládá se, že kaudální orgán slouží k chemické komunikaci, která souvisí s teritorialitou. Výzkumy, které by mohly potvrdit tuto hypotézu, nebyly nikdy uskutečněny či publikovány. Tato práce je tedy prvním krokem k funkční charakterizaci tohoto orgánu.

## **Cíle diplomové práce**

- Pomocí 454 pyrosekvenování vytvořit tanskriptomovou databázi kaudálního orgánu.
- Zjistit, zda se v kaudálním orgánu nacházejí molekuly spojené s chemickou komunikací.
- Na základě výsledků diskutovat o možné roli kaudálního orgánu v chemické komunikaci myšic rodu *Apodemus*.



## **1. Chemická komunikace**

### **1.1. Význam chemické komunikace u myšic rodu *Apodemus***

Chemická komunikace je pro myšice jakožto noční hlodavce klíčovým dorozumívacím systémem. Vizuální či akustické signály nejsou samozřejmě u myšic potlačeny. Z vizuálních signálů je dobré poukázat na zajímavý příklad tzv. way-markingu, kdy myšice během své průzkumné cesty pokládají na trase referenční body v podobě větviček či kamínků. Tyto referenční body slouží jedinci k orientaci. V případě, že je hlodavec vyrušen například predátorem, může se myšice díky těmto referenčním bodům po opuštění úkrytu velmi dobře zorientovat a pokračovat v průzkumné trase (Stopka & Macdonald, 2003). Ovšem toto značení neslouží ke komunikaci mezi jedinci, ale slouží spíše jen právě k vlastním potřebám jedince. Akustické signály jsou využívány k vyjádření rychlé změny psychického stavu, oznámení boje, volání mláďat či ochoty se pářit (Stoddart & Sales, 1985). Ve srovnání s chemickou komunikací není ale akustická komunikace tak efektivní na delší vzdálenost a je poměrně pomíjivá.

Chemická komunikace je v případě malých nočních hlodavců optimálním řešením. Tato komunikace probíhá přes biologicky aktivní látky – signalizační molekuly, původně dělené na odoranty a feromony (viz dále).

### **1.2. Signalizační látky**

V literatuře jsou většinou signalizační molekuly děleny na odoranty a feromony. Odoranty jsou chápány jako produkty prakticky jakéhokoliv organismu; jsou tvořeny pasivně jako odpadní látky nebo aktivně jako molekuly s cílenou signalizací (Touhara & Vosshall, 2009). Detekce těchto látek je zprostředkována v hlnu pokrývajícím čichovou sliznici za přítomnosti olfaktorických receptorů (dále ORs; Zou & Buck, 2006), které jsou umístěny na ciliích olfaktorických neuronů (Buck & Axel, 1991; Munger, Leinders-Zuffal & Zuffal, 2009). Navázání ligandu (odorantu) na olfaktorický receptor vytváří akční potenciál, který směřuje do olfaktorického bulbu v mozku (Imai & Sakano, 2009), kde je dále zpracováván.

Feromony se rozumí energicky nezávislé molekuly zahrnující velké organické látky, peptidy či proteiny (Touhara a Vosshall, 2009). Přesná definice termínu feromonu ale

neexistuje. Nejčastěji citovaná je definice Karlsona & Lüscher (1959). Feromon je podle těchto autorů „substance vypouštěná jedincem daného druhu, která vyvolává určité stereotypní chování a/nebo endokrinologickou odpověď v dalších jedincích stejného druhu“.

S novými výzkumy ohledně chemické komunikace ale není aktuální dělit tyto signalizační látky na feromony a odoranty. Je totiž velmi složité uchopit ať už výraz feromon či odorant. Původně se udávala totiž detekce feromonů tzv. vomeronasálním orgánem a detekce odorantů olfaktorickým epitelem. Dnes je toto tvrzení již překonáno, feromony mohou být totiž detekované i olfaktorickým epitelem (Keller et al, 2009). Některé odoranty jsou zase schopné svou vazbou aktivovat vomeronazální orgán (Trinh a Storm, 2003). Savčí feromony a odoranty se tedy mohou chovat jako feromony nebo jako odoranty v závislosti na jejich zpracování buď vomeronazálním orgánem, nebo olfaktorickým epitelem (Dulac and Tollero, 2003). Veyrac et al. (2011) v tomto kontextu zjistil, že samičky myši vnímají moč dominantního samce vomeronasálním orgánem, kdežto moč podřízeného samce přes olfaktorický epitel.

### **1.3. Vomeronazální orgán**

Vomeronazální (Jacobsonův) orgán byl poprvé popsán již v devatenáctém století, stejně jako jeho morfologie a funkční význam (Haplern, 1987). Vomeronazální orgán se nachází na kosti radličné (*vomer*; Weiler, 2005) a přítomný je u terestrických obratlovců. U vodních, létavých a arboreálních obratlovců se většinou udává jeho absence (Halpern, 1987). Na povrchu vomeronazálního orgánu jsou uloženy receptory dvou tříd – V1Rs a V2Rs (Matsunami & Buck, 1997). Signály z vomeronazálního orgánu směřují přes čichový lalok do amygdaly a hypotalamu, kde odpovědi na tyto signály mohou být behaviorální nebo endokrinní změny (Matsunami & Buck, 1997). U člověka, který postnatálně postrádá vomeronazální orgán (Rodriguez & Mombaerts, 2002), tvoří 90% V1R genů pseudogeny, funkční VRs jsou vystavovány na hlavním olfaktorickém epitelu. Geny pro vomeronazální receptory 2 třídy (V2R) jsou u člověka pouze v pseudogenizovaném stavu.

#### **1.4. První objevy signalizačních molekul (odorantů, feromonů)**

První doložené vědecké pozorování sexuálních feromonů bylo provedeno v devatenáctém století. J. H. Fabre zjistil, že samičky martináče (*Saturnia pavonia*) uzavřené v drátěných klíčkách jsou schopné přilákat samce svého druhu na vzdálenost až 11 km. Tato schopnost zmizela, když byly samičky hermeticky uzavřené. V té době ovšem vědci netušili, že jde o chemickou komunikaci zprostředkovanou molekulami. Fabre se tedy domníval, že jde o jistý typ radiace (Fabre cit. podle Hecker, 2004). Zájem o chemickou komunikaci odstartovala o několik desítek let později izolace prvního feromonu. Feromon byl pojmenován *bombykol* a izolován byl ze samiček bource morušového (*Bombyx mori*). Tento feromon je přijímán samcem bource a vyvolává u něj určité změny chování (Butenandt et al., 1959). Feromony byly pak postupem času nalezeny u všech živočišných kmenů.

#### **1.5. Biologická aktivita signalizačních molekul**

Funkce signalizačních molekul se udává ve spojitosti s pohlavím, kopulačním chováním či interakcemi mezi jedinci stejného i opačného pohlaví. Ve zbytku kapitoly je na příkladech vyskytujících se v přírodě ukázáno několik možností využití feromonů a jejich účinku.

Billeterer et al., 2009 specificky vyřadili geny kódující enzymy pro syntézu feromonů na uhlikovodíkové bázi u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Syntéza feromonů u těchto organismů probíhá ve speciálních buňkách v kutikule tzv. enocytech. Samice s vyřazenými geny byly pro samce překvapivě atraktivnější než samice neupravené. Samci byli ale zároveň ochotní se pářit se samci bez uhlovodíkových feromonů. V samčích enocytech totiž dochází k syntéze uhlovodíkové molekuly 7-tricosenu, která je pro ostatní samce odpudivá. V případě vyřazení syntézy této látky se tedy samci jeví jako samice.

Další z funkcí feromonů je modulace estrálního cyklu samic myší. Estrální cyklus je u volně žijících myší popisován s pravidelnou periodicitou 4-6 dní (Clarke, 1985; Brook 1984). Samice chované v zajetí v jednotlivých klecích měly délku estrálního cyklu až devět dní, samotný estrus pak trval jeden den (Stopka & Macdonald, 1998). Situace se změnila v přítomnosti další samice, v tomto případě byl estrus, kdy je samice receptivní, lehce potlačen (Lee-Bootův efekt; Lee & van der Boot, 1955). Naopak přítomnost nepříbuzných

samců zkrátila estrální cyklus a samotný estrus byl prodloužen, zde jde o tzv. Whittenův efekt (Stopka & Macdonald, 1998).

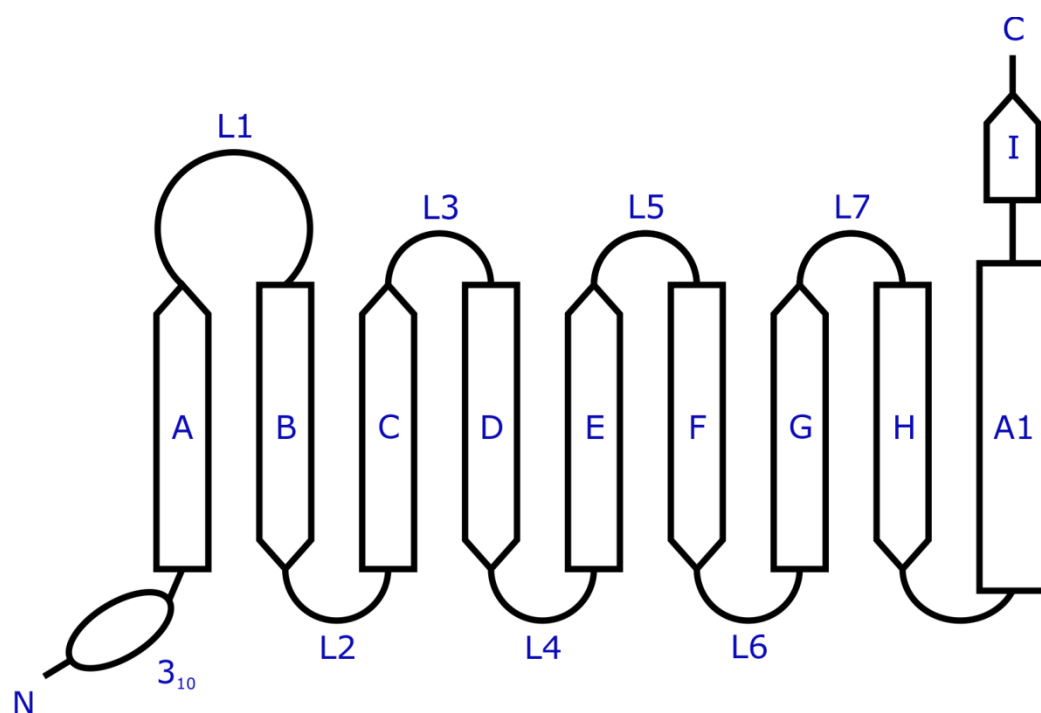
Existuje ovšem i mnoho případů zneužití účinků feromonů. Například bolasový pavouk (*Mastophora cornigera*) vytváří směs molekul, které původně vytváří samice několika druhů mūr jako sexuální atraktanty. Samci těchto mūr pak nekončí cestu u samice, ale v kusadlech dravého členovce (Stowe et al, 1987). Imitace feromonů není známa jen z živočišné říše. Rostliny opylované hmyzem nebo malými obratlovci jsou schopné produkovat biologicky aktivní molekuly, které jsou pro tyto opylovače atraktivní. Příkladem je orchidej *Ophrys insektifera*, která láká samce vosiček (*Argogorytes mystaceus*) směsí látek podobných feromonům samic (Borg Karlson, 1990). Samec pak svou pseudokopulací opyluje rostlinu. Tento fenomén je u rodu *Ophrys* velmi rozšířen i u jiných druhů (Schiestl et al, 2000; Mant et al; 2005).

## **2. Zdroje signalizačních molekul**

Zdroje chemických signálů jsou moč, fekálie, apokrinní či holokrinní žlázy. Většinou jsou tyto jednotlivé složky organismy využívány střídavě a navzájem se doplňují. Například jezevci evropští (*Meles meles*) používají ke komunikaci minimálně dva způsoby – pomocí fekálií a subkaudální žlázy (viz dále kapitola „Mazové žlázy“).

### **2.1. Molekuly přítomné v moči a jejich souvislost s chemickou komunikací**

Hlavním prostředkem dorozumívání u myší (*Mus musculus*) je moč. Nejdůležitější složkou moči jsou hlavní močové proteiny (MUPs, „major urinary proteins“). Tyto proteiny slouží jako ochrana feromonů během transportu z jater přes ledviny do moči (Stopka, Janotová & Heyrovský, 2007). Jejich syntéza probíhá hlavně v jaterních buňkách, exprimované jsou ale v určitém množství i v jiných tkáních, např. slzných, průšních, mléčných, podjazykových a podčelistních žlázách (Shaw et al., 1983). MUPy uvolňují své ligandy velmi pomalu, čímž se prodlouží jejich signál (Hurst et al., 1998). Struktura, která umožňuje navázání ligandu, se označuje jako  $\beta$ -barrel a v rodině malých extracelulárních proteinů lipokalinů, kam patří mimo jiné i MUPy, je velmi konzervativní (Flower, 1996, viz Obrázek 1). Tvořena je 8 antiparalelními listy značenými A-H, které jsou navzájem propojené smyčkami (L1-L7). L1 smyčka přitom slouží jako víčko pro vazebné místo (Flower, 1996).



Obrázek 1. Struktura  $\beta$ -barrelu lipokalinů. Převzato a upraveno z Flower et al, 1993.

MHC (hlavní histokompatibilní komplex, „major histocompatibility komplex“) je nepostradatelnou složkou imunitního systému i chemické komunikace. Je to komplex vysoce polymorfních glykoproteinů s funkcí rozeznat cizorodé částice a aktivovat imunitní odpověď (Rammensee et al., 1993). MHC glykoproteiny jsou dělené do dvou tříd – MHC I. třídy a MHC II. třídy. MHC II. třídy jsou vystavovány na buňkách prezentujících antigen T-lymfocytům.

MHC glykoproteiny I. třídy na sebe váží specifické peptidy a vystavovány jsou na površích jaderných buněk (Falk & Rotzschke, 1993). V případě, že není komplex MHC/peptid vystaven na povrch buněk, je uvolňován do extracelulárního prostoru, odkud se dostává do moči či jiných tělních sekretů (Singh, Brown & Roser, 1987). Tam se pak podílí na chemické komunikaci. MHC glykoproteiny totiž kódují informaci o genetické individualitě (Leinders-Zufall et al., 2004). Samice je schopná podle MHC proteinů rozeznat nepříbuzného samce a přednostně se s ním pářit (Egid & Brown, 1989). Ovšem v případě, že je samec infikován parazitem, což je opět možno rozeznat díky MHC, volí raději samice sice příbuznějšího, ale pro své potomky kvalitnějšího samce (Kavaliers & Colwell, 1995). Podstata rozeznání příbuzného MHC nespočívá ve „znalosti“ samice svého vlastního MHC, které „porovnává“ s ostatními jedinci. Roli zde hraje okolí, ve kterém samice vyrůstá. Během ontogenetického vývoje dochází k imprintingu haplotypů MHC

jedinců žijících kolem samice, což jsou většinou rodiče či sourozenci. Penn & Potts, 1998 zjistili, že samičky, které vyrůstaly v prostředí svých příbuzných, se přednostně pářily se samci nepříbuznými. Když ale samice vyrůstaly v prostředí nepříbuzných jedinců, volily pak k spáření samce biologicky příbuzné. V ontogenezi jim byl sice vštěpen haplotyp nepříbuzných samců, ale pro samice se tyto samci jeví jako příbuzní.

#### **2.1.1. Efekty močových značek**

Bruceov efekt je jedním z mnoha příkladů fyziologického ovlivnění samic chemickou komunikací. Bruceová provedla sérii pokusů, kde objevila vliv přítomnosti samců či samic (a jejich moči) na březost samice. Bruceová ve svém výzkumu spářila inbrední samice s inbredními samci a po oplození samic samce odebrala z klece. Samice pak umístila do klecí, kde je vystavila 24 hodinové přítomnosti jiných samic nebo samců. K přerušení březosti pak došlo v klecích s cizími samci z volné přírody z 71%, v kleci s cizím samcem z inbredního kmene z 28% a v kleci s kastrováním inbredním samcem z 26%. Samice umístěné v kleci s jinými samicemi či s původním samcem zůstaly březí (Bruce, 1959 cit. podle Kelliher & Wersinger 2009). Po přerušení březosti došlo do týdne u samice k opětovnému navození estru (Parkes & Bruce, 1961).

Dráha, která vede až k abortu myši, je vedená přes vomeronasální orgán. Samice s operativně odebraným vomeronasálním orgánem v přítomnosti cizího samce o své potomky nepřišly (Bellringer et al., 1980). Jaká je ale podstata rozeznání cizího samce samicí? Svou úlohu zde opět splňují MHC glykoproteiny. Samice totiž během páření vnímá chemosignály (MHC) samce, během 3-7 hodin si je zapamatovává a v paměti jí zůstávají až 30 dní (Kelliher & Wersinger, 2009). Samec s MHC haplotypem pro samici neznámým pak u této samice vyvolá Bruceov efekt.

Dalšími efekty studovanými na myši je Whittenův a Lee-Bootův efekt, které jsou popsány podrobněji v kapitole 1.5. „Biologická aktivita signálních molekul“. Dalším efektem je Vandenbergův efekt. J. G. Vandengergh (1973) zjistil, že samice v přítomnosti samců (a jejich chemosignálů) dříve dospějí a nástup jejich ovulace je urychlen. Součástí tohoto efektu jsou samičí gonadotropní hormony (luteinizační hormon - LH, folikuly stimulující hormon - FSH), které ovlivňují exkreci pohlavních hormonů estrogenu a testosteronu (Vandenberg, 1973). Hlavní vliv mají samčí ligandy navázané na MUPy -

thiazol, brevicomin,  $\alpha$ - a  $\beta$ -farnesen a 6-hydroxy-6-methyl-3-heptaton (Novotny et al., 1999A,B). Přijímány jsou samičím vomeronazálním orgánem a způsobují zvýšenou produkci LH do 30 minut od kontaktu se samcem.

Molekuly obsažené v moči tedy podle těchto příkladů hrají nemalou roli v sociálních interakcích hlodavců, jmenovitě myši (*Mus musculus*). U myšic rodu *Apodemus* ovšem MUPy v moči nebyly nalezeny v takové koncentraci, aby se mohly účastnit chemické komunikace. K pochopení komunikace mezi myšicemi rodu *Apodemus*, musíme přejít k jiným komunikačním prostředkům - mazovým žlázám.

## **2.2. Mazové žlázy**

Mazové žlázy jsou většinou asociovány s vlasovými folikuly a tvoří spolu komplex tzv. pilosebaceózní jednotku (Smith & Thiboutot, 2008). Mazové žlázy obsahují tři typy buněk - nerozlišené, zrající a zralé (Jenkinson et al., 1985) – a prochází čtyřmi vývojovými fázemi – anagenem, katagenem, telogenem a exogenem. Zkráceně lze anagen popsat jako růst a diferenciaci buněk žlázy, katagen jako regresy a apoptózu, telogen jako klidovou fázi a během exogenu dochází k uvolnění starého vlasového folikulu (Schneider et al., 2009). Nerozlišené buňky jsou po obvodu mazové žlázy. Během svého zrání migrují do středu buňky, kde zrání buňky plné lipidů končí apoptózou, prasknutím a uvolněním obsahu do kanálu vlasového folikulu. Odumřelá buňka je součástí sekretu, mazové žlázy jsou tedy v tomto případě holokrinního typu. Druhým typem jsou žlázy apokrinní. Sekrece jejich obsahu je provázena rozpadem apikální části buňky (Charles, 1959). Buňka tedy nepodléhá apoptóze, jako je tomu u holokrinního typu, ale je pouze narušena pro sekreci obsahu.

Žlázy slouží nejen k péči o pokožku, ale jsou i významným zdrojem signalizačních molekul živočichů. U savců je jejich uložení druhově specifické. Lokalizovány jsou například na bocích, kolem očí, genitálií nebo análního otvoru (Wyatt, 2003). Využívány jsou k vystavení chemického signálu na objekty v prostředí nebo na jedince stejného druhu, toto chování živočichů se označuje jako „marking“ (Ewer, 1968). Typy žláz a jejich využívání se mezi organismy objevují ve vysokém počtu.

Králík divoký (*Oryctolagus cuniculus*) využívá ke komunikaci tři typy žláz – anální, žlázu uloženou v tříslech a žlázu submandibulární, přičemž využití každé z těchto žláz je

spojeno s určitým typem chování. Submandibulární a anální žláza hraje roli ve značení okolního prostředí. Sekret anální žlázy je přitom z těla vylučován společně s fekáliemi, není to ovšem pravidlem. Králíci rozptylují neoznačené výkaly různě v prostředí, ale označené hromadí na speciálních místech svého teritoria. Poslední žláza s uložením ve tříslech slouží pravděpodobně k individuální identifikaci (Goodrich & Mykytowicz, 1972). Nahrává tomu i fakt, že samice napadají svá mláďata potřená sekretem jiného jedince právě z této žlázy (Mykytowicz & Dudzinski, 1966). U sekretu z anální žlázy se tak neděje. Složky sekretu žlázy uložené v tříslech jsou tri-, di- a monoglyceridy. V sekretu potních žláz uložených v blízkosti žláz tříslových se předpokládá přítomnost uhlovodíků, volných mastných kyselin a cholesterolu. 1D elektroforéza sekretu žláz ukázala poměrně velké rozdíly mezi jednotlivými jedinci i mezi samotnými žlázami (Goodrich & Mykytowicz, 1972).

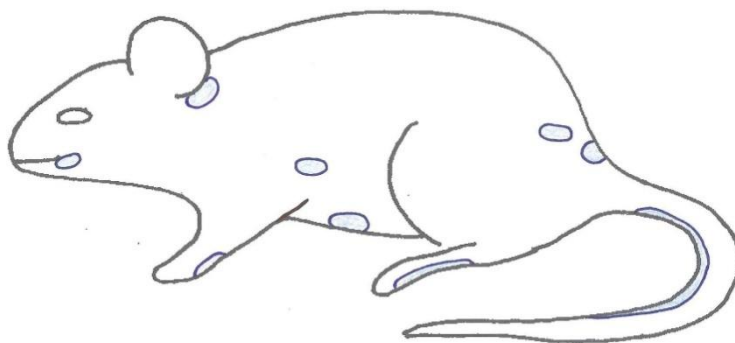
Typický zápach ze subkaudální žlázy jezevce evropského (*Meles meles*) je vytvářen bakteriální faunou, která uvnitř orgánu metabolizuje primární produkty žláz (Albone et al., 1978). Orgán je tvořen vakem lemovaným vrstvou mazových žláz, které jsou proložené potními buňkami (Stubbe, 1971). Vylučovaný sekret svou konzistencí připomíná margarín, tvořen je hlavně nenasycenými mastnými kyselinami a vodou (Gorman et al., 1984). Každá sociální skupina jezevců má pro svou skupinu typický zápach, který se udržuje tzv. allo-markingem, kdy k sobě jedinci vzájemně přitisknou žlázu a vymění si bakteriální faunu (Buesching, Stopka & Macdonald, 2003). Sekret ale kóduje nejen sociální skupinu, ale i individualitu, pohlaví a další specifické parametry, jako jsou věk, tělní kondice a reprodukční stav jezevce (Buesching, Waterhouse & Macdonald, 2002). Jezevci tedy žijí v sociálních skupinách a své teritorium si pečlivě hlídají proti vetřelcům. Pro nevítané hosty zanechávají na okrajích svého teritoria výstražné značky v podobě fekálií oznamujících vstup na cizí území (Buesching & Macdonald, 2001).

Mazové žlázy se objevují i u skupin živočichů, jako jsou kopytníci. Příkladem může být antilopa chocholátka s mazovými žlázami pod očima. Tyto žlázy slouží k značení okolního prostředí, ale i jedinců navzájem, kdy si jedinci navzájem označí jednu stranu obličeje a následně druhou (Ralls, 1971).



### 2.2.1. Žlázy čeledi Muridae

Hlodavci jsou živočichové hojně využívající chemickou komunikaci pomocí exogenních žláz. Uložení některých využívaných žláz na hlodavčím těle znázorňuje Obrázek 2.



Obrázek 2. Schematické zobrazení žláz na těle hlodavců. Struktura na ocase znázorňuje i kaudální orgán myšic rodu *Apodemus*. Převzato a upraveno z Niethammer, 1969.

Harderianova žláza je struktura uložená v oblasti oka, která se nachází u mnoha terestických obratlovců (Sakai & Yohro, 1981). Sekreční činnost Harderianovy žlázy je ovlivněna jak exogenními (světlo a teplota); tak endogenními (např. prolaktin, hormony štítné žlázy a steroidní hormony) faktory, které se liší mezi jednotlivými druhy (Monteforte et al., 2008). Přesná funkce není úplně jasná, ale žláza mohla by být zdrojem lubrikačních látek pro oko, sekundárním centrem imunitní odpovědi (Mueller, Sato & Glick, 1971; Burns, 1979), zdrojem feromonů (Payne, 1979), či růstových faktorů (Seyama et al., 1992), nebo by mohla hrát roli v termoregulaci (Thiessen, 1988). U hlodavců je většinou tato žláza spojována s biosyntézou porfyrinu, neboť obsahuje protoporfyrin. Asociovaná je s lakrimálními žlázami. U samců myši (*Mus musculus*) je v lakrimálních žlázách do slz uvolňován „exocrine-gland-secreting-peptid 1“ (ESP1; Kimoto et al., 2005). ESP1 je detekován receptory vomeronazálního orgánu. Tento netěkavý peptid o velikosti 7kDa je tedy feromonem nesoucím informaci o pohlaví a druhu (Kimoto et al., 2007) a hraje významnou roli v komunikaci samec-samice.

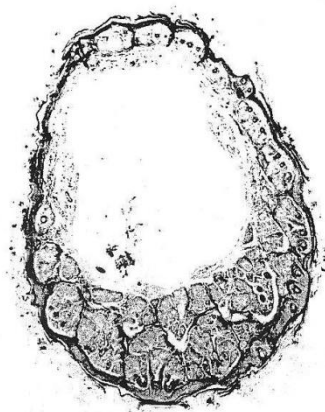
Dalšími neméně důležitými žlázami jsou žlázy slinné. Jsou mimo jiné zdrojem hlavních slinných proteinů (Hwang, Hofstetter, Bonhomme & Karn, 1997), tzv. ABP („androgen-binding protein“) se schopností vázat testosteron a progesteron (Karn, 1998). Tyto proteiny jsou složeny ze tří podjednotek a $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  kódovaných geny Abpa,

Abpb a Abpc (Dlouhy et al., 1987). U myši (*Mus*) se navíc objevuje přítomnost tří variant genu Abpa – Abpaa, Abpb a Abpc. Zajímavé na tom je, že každá z těchto variant se fixovala u jednoho z poddruhů *Mus musculus* – *domesticus*, *musculus* a *castaneus*. Jedinci jsou pak dokonce schopní rozlišit nositele stejného ABP (Laukaitis et al., 1997).

V následující kapitole je souhrn literatury a informací o mazové žláze myšic rodu *Apodemus*, poměrně velkém orgánu, který na určení své pravé funkce zatím čeká.

### 3. Kaudální orgán

Kaudální orgán byl poprvé popsán u samců *Apodemus flavicollis* (Niethammer, 1969). Jedná se o mazovou žlázu na ventrální straně ocasu. První výzkumy tohoto orgánu připisují jeho přítomnost pouze samcům *Apodemus flavicollis*, naopak orgán nebyl popsán u samců *Apodemus sylvaticus*. Podle autora by se mohlo jednat o znak, díky kterému bychom tyto dva druhy od sebe odlišili. Pozdější práce již poukazují na přítomnost kaudálního orgánu nejen u samců ostatních druhů (tedy *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. agrarius* a *A. uralensis*) žijících na území České republiky (Stoddart 1971), ale i u samic a mladých, sexuálně nezralých jedinců (Stoddart 1971, Stoddart a Sales 1985).



Obrázek 3. Průřez ocasem samce *Apodemus flavicollis*. Kaudální orgán. Převzato ze Stoddart & Sales, 1985.

Kaudální orgán vznikl zbytněním mazových žláz vlasových folikulů. Zbytnění žláz kaudálního orgánu je postupné a opět pomalu odeznívá, není tedy přesně jasné, kde kaudální orgán začíná a kde končí. Udává se ale, že kaudální orgán zabírá asi třetinu ocasu se začátkem na 2. - 4. mm a koncem přibližně na 30. mm od kořene ocasu; kořen ocasu je zde myšlen poslední bederní obratel (Stoddart, 1971). Tvar kaudálního orgánu u všech

druhů je tedy elipsa s největším zbytněním tkáně mezi 8. až 20. mm od kořene ocasu (Stoddart, 1971).

Niethammer (1969) se ve své práci zabývá druhem *Apodemus flavicollis* a udává přítomnost kaudálního orgánu pouze u samců tohoto druhu (Niethammer, 1969). *Apodemus flavicollis* navíc Niethammer srovnává s velmi podobným druhem *Apodemus sylvaticus*, přičemž u *A. sylvaticus* právě uvádí absenci kaudálního orgánu. Tyto dva druhy jsou si fenotypově podobné a je problematické je odlišit (viz Box 1). Niethammer se tedy snažil najít spolehlivý rozpoznávací znak těchto dvou druhů a kaudální orgán se jím zdál být. Stoddart ve své studii již uvádí, že kaudální orgán se vyskytuje u všech čtyř druhů myšic rodu *Apodemus*, druhy se liší pouze mírou vývinu kaudálního orgánu. Nejvíce je orgán vyvinut u *Apodemus flavicollis*, míra vývinu pak klesá u druhů v následujícím pořadí: *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus agrarius*, *Apodemus uralensis* (Stoddart, 1971). Jako rozpoznávací znak se tedy nemůže brát absence či přítomnost kaudálního orgánu, jak se domníval Niethammer, ale míra vývinu orgánu.

#### BOX 1

##### *Apodemus flavicollis* versus *Apodemus sylvaticus*

Jako rozpoznávací znaky *Apodemus flavicollis* a *Apodemus sylvaticus* se uvádějí: délka zadní končetiny (*A. flavicollis* 22-27mm; *A. sylvaticus* 20-23mm; Aulagnier et al, 2008), přechod mezi zbarvením bílé srsti břicha a rezavohnědého hřbetu (*A. flavicollis* má přechod jasný, ostrý; *A. sylvaticus* postupný) a nakonec přítomnost či absence žluté náprsenky charakteristické pro *A. flavicollis* (čemuž napovídá i anglický název této myšice „yellow necked mouse“). Tento znak u *Apodemus sylvaticus* vždy chybí. Ovšem spolehlivý tento znak úplně není, neboť u *Apodemus flavicollis* může náprsenka také chybět.

### **3.1. Sekret kaudálního orgánu a informace v něm uložené**

Na povrch ocasu je z kaudálního orgánu vylučován mléčně zbarvený sekret. Tento sekret vzniká rozpadem buněk (Niethammer, 1969) a na povrch ocasu se dostává podél vlasových folikulů (Stoddart, 1971). Uchovává v sobě informace o druhu, pohlaví, věku, sezónnosti (rozumějme sexuální kondici) a populační příslušnosti (Stoddart & Sales, 1985), slouží tedy jako vizitka jedince. V sekretu se předpokládá přítomnost triglyceridů (Stoddart & Sales, 1985).

Použitím metody plynové chromatografie se získal profil složek sekretu kaudálního orgánu. Podstata rozdílů ve složení sekretu mezi druhy není v kvalitě složek, ale v množství přítomných složek (přesněji poměru složek). Variabilita sekretu se ovšem neobjevuje jen na úrovni druhu ale i vnitrodruhově. Existují totiž rozdíly mezi populacemi. Ve výzkumu prováděném na Britských ostrovech byly porovnány vzorky z osmi různých populací. Zjistilo se, že variabilita sekretu je větší mezi populacemi než uvnitř nich (Gorman, 1982). Druhá studie byla provedena na dvou populacích *Apodemus sylvaticus*, jedné z Nepálu a druhé z Anglie. Ač byla potrava pro tyto dvě populace odlišná, nelišily se profily sekretu natolik, aby nebylo možné určit druh (Stoddart, 1977 cit. podle Stoddart & Sales, 1985).

Přítomnost kaudálního orgánu byla potvrzena jak u samců, samic tak, i mladých jedinců druhů myšic rodu *Apodemus*. U samic a mladých jedinců je kaudální orgán morfologicky stejný jako u samců, je jen méně vyvinut. Na povrch ocasu je vylučován sekret jako u samců, ale chemický profil složek je odlišný. Samci mají profil nejkomplexnější. Samicím a mladým, sexuálně nezralým jedincům obou pohlaví určité složky chybí, ale profily mají velmi podobné (Stoddart & Sales, 1985). Hlavní rozdíly mezi samci a samicemi jsou ve vyšší koncentraci chemických složek s vyšší teplotou varu u samců než u samic (Gorman, 1982). Zajímavým poznatkem je fakt, že kastrování samci nemají komplexní profil, jejich sekret odráží spíše samičí profil. Androgenizované samičky pak vylučují sekret podobný samčímu (Gorman, 1982). Kaudální orgán je tedy pod vlivem testosteronu a mezipohlavní rozdíly jsou určeny jeho cirkulací.

Během roku dochází u kaudálního orgánu k fenotypovým změnám. Na jaře je kaudální orgán rapidně zvětšen (hlavně u samců *Apodemus flavicollis*) a sekret se na povrch ocasu dostává velmi snadno (Stoddart & Sales, 1985). Změna ale probíhá během roku i ve složení sekretu na úrovni jedince. Vzorky stejného druhu sebrané v dubnu a v červnu se od sebe lehce lišily. Následné získání vzorků v dubnu dvou po sobě jdoucích roků ukázaly na menší odlišnosti. Profil sekretu tedy není během roku stálý (porovnávání sekretů proběhlo pomocí Spaermanova testu s hodnotami 0,47 pro duben/červen a 0,63 pro duben/duben, Stoddart, 1971; Stoddart & Sales 1985).

Předpokládaná funkce kaudálního orgánu je značení teritoria, ale o tom více v kapitole „Diskuze“.

### 3.2. Kaudální žláza pytlouše rodu *Perognathus*

Několik let před popsáním kaudálního orgánu u myšic byla tato specializovaná mazová žláza popsána u pytloušů rodu *Perognathus* (Quay, 1965). S kaudálním orgánem myšic tato žláza sdílí velmi podobné znaky. Jde o mazovou žlázu na ventrální straně ocasu. Hloubka mazové tkáně je u tohoto druhu až 1mm, což je více než u myšic rodu *Apodemus*. Tloušťka orgánu je u *Apodemus flavicollis* kolem 0,9 mm. Na dorsální straně nejsou žlázy vlasových folikulů u rodu *Perognathus* stejně jako u rodu *Apodemus* nikterak zvětšené. Rod *Perognathus* je rozdělen na dva podrody, *Perognathus* a *Chaetodipus*. Větší kaudální orgán se objevuje ve větší míře u zástupců podrodu *Chaetodipus*. U myšic rodu *Apodemus* se nejdříve uvádělo, že samice tento orgán postrádají. Zajímavé na kaudálním orgánu amerických hlodavců je fakt, že u některých zástupců podrodu *Chaetodipus* mají naopak větší mazovou žlázu samice než samci (př. *Perognathus hispidus*, *P. intermedius*). Předpokládá se, že tato žláza hraje roli v olfaktorické komunikaci a značení teritoria. Navrhuje se také, zda není kaudální orgán vyvinutější u jedinců žijících v aridnějším prostředí, kde by mohl hrát roli v péči o pokožku.

Z této kapitoly je patrné, že kaudální orgán myšic rodu *Apodemus* a pytloušů rodu *Perognathus* jsou si v mnohém velmi podobné.

## **4. Metodika**

### **4.1. Pracovní podmínky**

Po celou dobu práce s biologickým materiálem jsem dbala na sterilitu práce, používala jsem špičky s dvojím filtrem (Eppendorf), plastové sterilní mikrozukmavky (Eppendorf) a vždy nosila latexové rukavice.

### **4.2. Pracovní materiál**

Před vlastní prací s biologickým materiálem jsem pracovní plochu a nástroje sterilizovala RNaseZapem (Sigma-Aldrich).

Sekret a tkáň z kaudálního orgánu jsem odebírala dospělým jedincům *Apodemus flavicollis* (podrobněji viz dále u jednotlivých metod). Jedinci byli chováni ve stejných podmínkách s přísunem živin a tekutin *ad libitum* a světelným režimem 12-12.

### **4.3. Transkriptomová část**

Samec *Apodemus flavicollis* použitý pro odběr RNA a následnou sekvenaci transkriptomu byl chycen v okolí rybníka u Velkých Bílovic (okres Břeclav, Jihomoravský kraj). K odebrání vzorku jsem použila preparační sadu a sterilizovala omytím 96% etanolem a opálením nad lihovým kahanem. Jako pracovní podložku jsem zvolila polystyrénovou desku obalenou aluminiovou folií očištěnou RNaseZAP (Sigma-Aldrich). Tento materiál se osvědčil jako vhodnější plocha pro práci s jemnou tkání kaudálního orgánu (oproti např. voskové vaně). Ocas s kaudálním orgánem jsem od těla jedince po usmrcení cervikální dislokací oddělila nůžkami. Ocas jsem směrem od kořene ocasu ke špičce nastříhla na dorzální straně přibližně do 2/3 délky ocasu. Pomocí pinzet jsem od sebe oddělila páteř a kůži ocasu. Kůži jsem připevnila na pracovní podložku dorzální stranou (orientací pokožkou na podložku). Následně jsem z kaudálního orgánu pomocí skalpelu jemným stíráním získala sekret. Tento sekret jsem rozdělila do dvou zkumavek (druhá část byla využita na proteomickou analýzu). Do třetí zkumavky jsem odebrala i část škáry z oblasti kaudálního orgánu.

Vzorky tkáně a sekretu jsem zpracovávala ve 2ml homogenizačních mikrozukmavkách s MagNA Lyser Green Beads (Roche) ve 350μl směsi RLT pufru (RNeasy

Mini Kit, Qiagen, Roche) a  $\beta$ -merkaptoetanolu (Sigma-Aldrich) v poměru 10 $\mu$ l  $\beta$ -ME na 1ml RLT. Vzorky jsem homogenizovala v MagNA Lyser (Roche) homogenizátoru při 6000 otáčkách/min po dobu 30 sekund.

#### 4.3.1. Izolace RNA

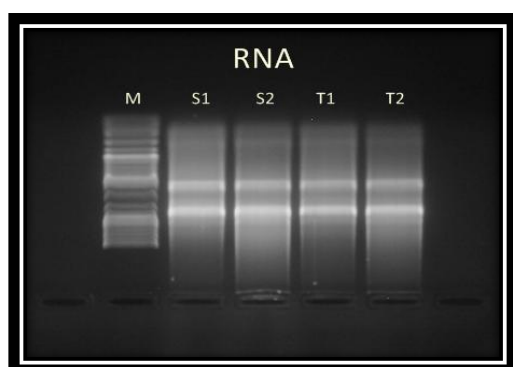
RNA jsem z homogenizačních zkumavek izolovala pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen) dle standardního protokolu pro živočišné tkáně. Princip této metody spočívá v selektivní vazbě RNA všech typů o délce >200 bp na silikátovou membránu kolonky. Zbavila jsem se tak ostatních molekul (tuky, cukry, proteiny atd.), případnou kontaminaci DNA jsem odstranila inkubací membrány s navázanou RNA s DNAsou (viz protokol Optimální krok). Pro eluci RNA do 1,5ml sběrné zkumavky jsem použila 30  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O („nuclease – free water“, Ambion).

#### 4.3.2. Kontrola kvality a měření koncentrace RNA

Kontrolu jsem provedla pomocí klasické gelové elektroforézy (AGE). K změření koncentrace a čistoty roztoku jsem použila NanoDrop ND-1000 viz Tabulka 1. Z pěti samců A-E jsem na základě výsledků měření kvality RNA a vizuální kontroly na gelu vybrala pro další kroky vedoucí k sekvenaci samce B viz Obrázek 4.

Tabulka 1. Výstup měření koncentrace mRNA z NanoDrop ND-1000.

Druh	Vzorek	Tkáň	A260/280	A260/230	Koncentrace (ng/ $\mu$ l)
<i>Apodemus</i>	B	Sekret	2,13	2,28	506,4
<i>flavicollis</i>		Škára	2,13	1,96	344,3



Obrázek 4. Gelová elektroforéza RNA jednice B. M=marker, S=sekret, T=tkáň, S2 a T2 s dvojnásobnou koncentrací S1 a T1.

#### 4.3.3. Reverzní transkripce

Přepis mRNA do cDNA jsem provedla pomocí SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) podle protokolu Trimmer-2 Normalization Kit z důvodu využití modifikované primeru 3' SMART CDS Primer II A (5'-AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTGTCTTTTTTCTTTTTTTTTTVN-3'). Tento primer je vhodný pro sekvenování 454 metodami díky občasným přerušením polyA sekvence jiným nukleotidem. Za laskavé využití děkuji Jakubovi Riedlovi z AV ČR.

Ve chvíli, kdy reverzní transkriptáza (SMARTScribe RT) dosáhne 5'konce mRNA, připojí terminální transferázová aktivita reverzní transkriptázy na 3'konec ssDNA několik dalších nukleotidů. ssDNA je tímto oligonukleotidovým úsekem označena. Toto značení je dále využito v následné amplifikaci pomocí „nested“ PCR, při které se vyhnu amplifikaci krátkých vláken cDNA, které vznikají kvůli předčasné terminaci transkripce. PCR je tedy založena na amplifikaci cDNA, která je označena na obou koncích pomocí CDS primerem, resp. oligonukleotidovým úsekem.

Přepis jsem prováděla na směsném vzorku mRNA sekretu a tkáně (S1 a T1), počáteční koncentrace 1000ng/μl (poměrem 1μl mRNA sekretu a 1,5μl mRNA škáry).

#### 4.3.4. cDNA amplifikace

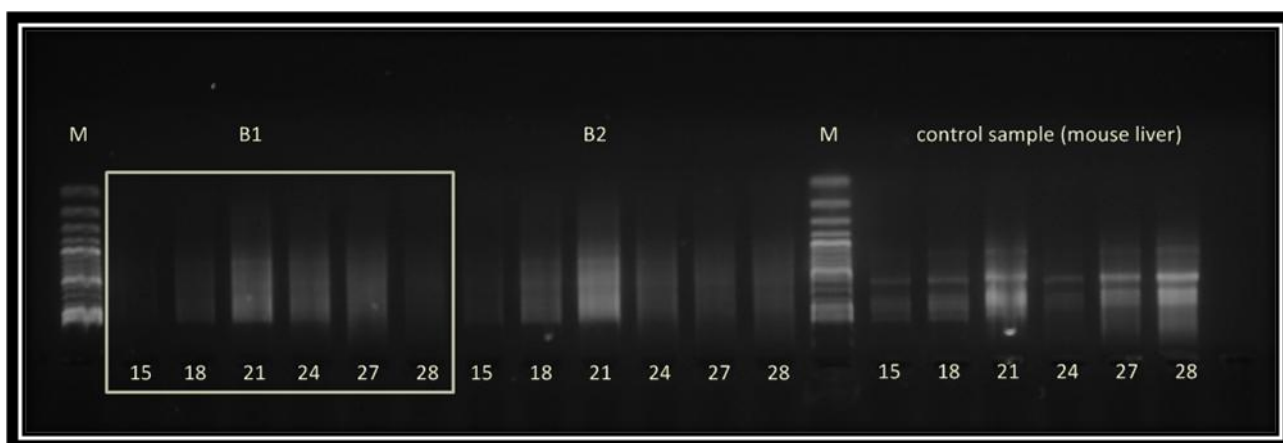
cDNA amplifikaci jsem provedla pomocí SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) s parametry PCR reakce viz Tabulka 2. Nejdůležitější část amplifikace je optimalizace počtu PCR cyklů. Jde o postup, který vede k ideální koncentraci cDNA při minimálním počtu chyb.

Tabulka 2. Parametry PCR reakce.

	Čas (sekundy)	Teplota °C
Úvodní denaturace	60	95
Denaturace	15	95
Nasedání primerů	20	66
Extenze (syntéza DNA)	180	72
	∞	4

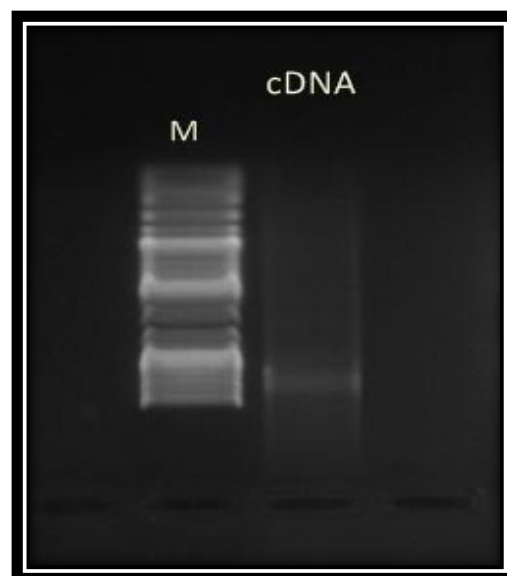


K účelům amplifikace jsem po 15. cyklu amplifikace rozdělila vzorek do dvou zkumavek o objemu 30  $\mu$ l, resp. 70  $\mu$ l. Vzorek o objemu 70  $\mu$ l jsem po 15. cyklu inkubovala na ledu. Na vzorku o objemu 30  $\mu$ l jsem provedla optimalizaci PCR cyklů. Během amplifikace jsem odebírala 5  $\mu$ l PCR produktu po 15., 18., 21., 24., 27. a 28. cyklu PCR a každý PCR meziprodukt jsem uschovala v lednici. Ideální počet PCR cyklů jsem pak určila porovnáním PCR produktů uvedených cyklů pomocí 1,5% agarózového gelu (viz Obrázek 5). Při ideálním počtu cyklů tvoří abundantní transkripty středně silné pruhy (vztaženo k pruhům 1kb žebříku), co možná nejostřejší. Když se pruhy jeví jako rozmazané, jde pravděpodobně o větší množství PCR cyklů, než je optimum. Když nejsou pruhy jasně viditelné, jde pravděpodobně o menší počet PCR cyklů. U mého vzorku nebyly pruhy jasně ohraničené, cDNA se jevila spíše jako „smear“. Po 18. cyklu byl „smear“ nejasný a při 21. byl signál naopak moc silný, zvolila jsem tedy 19 PCR cyklů jako optimální počet.



Obrázek 5. Gelová elektroforéza vzorků při optimalizaci počtu PCR cyklů. M = marker, B1,B2 = vzorky. Rámeček znázorňuje vzorek, který byl vybrán pro sekvenaci na GS Junior (Roche).

Po amplifikaci jsem vzorky přečistila pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) dle protokolu. Tento kit obsahuje indikátor pH pro stanovení optimálního pH vazby cDNA na silikátovou membránu. **Vzorek by měl mít plně žlutou barvu. V mém případě se tak nejevil, proto jsem přidala 10  $\mu$ l sodium acetátu.** Tento nenápadný krok je velmi důležitý pro efektivní vazbu cDNA na silikátovou membránu. V případě vynechání tohoto kroku může dojít k velké ztrátě cDNA. Po přečistění jsem kvalitu cDNA zkontrolovala na 1,5% agarózovém gelu (viz Obrázek 6).



Obrázek 6.

Gelová elektroforéza přečistěné cDNA.

#### 4.3.5. Příprava cDNA knihovny

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Petrovi Klemptovi a Lence Bulvové za jejich odbornou pomoc při přípravě knihovny na vlastní sekvenování.

K přípravě cDNA knihovny pro sekvenaci jsem použila protokol Rapid Library Preparation Method Manual (454.com) a GS Rapid Library Preparation Kit (Roche). Nebulizoval jsem pro vyšší tlaku 35Ψ (doporučovaným odborníky z Roche) oproti udávanému tlaku 30Ψ.

#### 4.3.6. Zpracování výsledků a databáze

Výsledky sekvenace jsem zpracovala pomocí systémového programu GS Reference Mapper (Roche), při využití standardního nastavení (doporučeno odborníky Roche) a aktuální transkriptomové databáze *Mus musculus* ([ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-75/fasta/mus\\_musculus/cdna/](ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-75/fasta/mus_musculus/cdna/) volba *Mus\_musculus.GRCm38.75.cdna.all.fa.gz*) a timing databáze vytvořenou Janou Nekvindovou. Přiřazení jmen kontigů jsem provedla pomocí ID transkriptů, na které byly kontigy mapovány za využití Biomart (<http://www.ensembl.org/biomart/martview>).

#### 4.4. Proteomická analýza

Proteiny lze studovat dvěma přístupy – klasickou metodou a tzv. „shot-gun“ metodou. Principem klasické metody je práce s celými bílkovinami za použití některé ze separačních

metod (kapalinová chromatografie, gelová elektroforéza), štěpení trypsinem na peptidové řetězce a analýzy na hmotnostním spektrometru.

U „shot gun“ strategie jsou bílkoviny fragmentovány trypsinem během prvních kroků práce a dále se pracuje se směsí peptidových řetězců v podstatě podobnými způsoby jako s bílkovinami u klasické metody.

Zvolila jsem klasickou metodu s využitím NuPAGE® Novex Midi gelu a hmotnostního spektrometru Orbitrap (LC – MS/MS).

#### 4.4.1. NuPAGE® Novex Midi gel

NuPAGE® Novex Midi gely jsou založeny na migraci proteinů elektrickým polem v neutrálním pH (7.0), které zaručuje maximální stabilitu proteinů i gelové matrix během elektroforézy. Proteiny mohou migrovat v denaturační (Bis-Tris a Tris-Acetát gel) či v nativní konformaci (Tris-Glycine gel).

NuPAGE® Novex Midi gely jsou dostupné v různých koncentracích acrylamidu a s různým počtem jamek pro vzorky. Objem jamek pak závisí na počtu jamek na gelu. Všechny typy gelů jsou 1mm široké viz Tabulka 3.

Tabulka 3. Technické údaje dostupných typů NuPAGE® Novex Midi gelů.

Vlastnosti	Bis-Tris Gel	Tris-Acetát Gel	Tris-Glycine Gel
<b>Koncentrace acrylamidu pro separaci</b>	8%, 10%, 4-12%	3-8%	8%, 10%, 12%, 4-12%, 4-20%, 8-16%
<b>Koncentrace gelu pod jamkami</b>	4%	3,2%	4%
<b>Počet jamek</b>	12+2, 20 a 26	12+2, 20 a 26	12+2, 20 a 26
<b>Velikost separovaných proteinů</b>	Malá až střední (1-200kDa)	Střední až velká (36-400kDa)	Malá až střední (6-200kDa)

K proteomické analýze jsem použila 5 samců *Apodemus flavicollis* chycené na lokalitě Velké Bílovice (okres Břeclav), které jsem pro přehled označila A, B, C, D a E. U vzorku C

jsem provedla ředící řadu pro optimalizaci množství sekretu pro další případné proteomické analýzy (viz Obrázek 8).

Ke každému ze vzorků jsem přidala 100 $\mu$ l (ke vzorku C 200 $\mu$ l) destilované vody a zvortexovala, čímž se vytvořila homogenní směs. Vzorek C jsem pak rozdělila do tří zkumavek a označila C1 (100 $\mu$ l), C2 (60  $\mu$ l) a C3 (40  $\mu$ l). Vzorky jsem dále centrifugovala při maximálních otáčkách 5 minut, díky čemuž se oddělila kapalná fáze s proteiny a pevná fáze těžších molekul a buněk, které na dně vytvořily peletu. Solvent (destilovaná voda) s proteiny jsem odpipetovala do nové zkumavky.

Pro vysrážení proteinů jsem použila 1 ml acetonu (10x objem vzorku), respektive 0,6ml u C2 a 0,4ml u C3. Vzorky jsem vortexovala a následně centrifugovala při 14 000 rpm. Proteiny vytvořily na dně zkumavek peletu, aceton jsem odpipetovala. Vzorky jsem nechala 30 minut schnout na vzduchu, aby se odpařil zbývající aceton. K elektroforéze jsem využila NuPAGE® Novex Midi Bis-Tris gel (Invitrogen) – viz Tabulka 4.

Tabulka 4. Technické údaje NuPAGE® Novex Midi gelu využitého pro elektroforézu sekretu kaudálního orgánu.

Typ gelu	Bis-Tris Gel
Koncentrace acrylamidu pro separaci	10%
Koncentrace gelu pod jamkami	4%
Počet jamek	26
Objem jamek	15 $\mu$ l
Velikost separovaných proteinů	1-200kDa

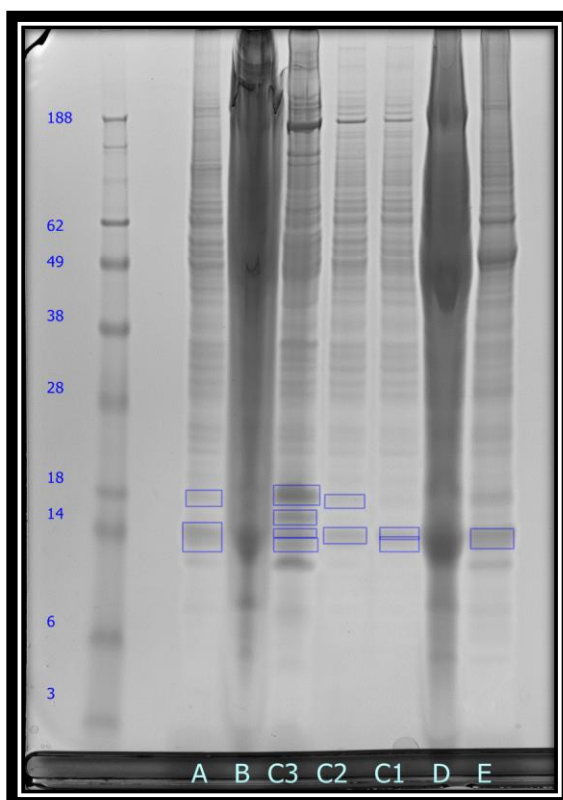
Dále jsem postupovala dle Non-reduced Sample protokolu NuPAGE® Novex Midi Bis-Tris gel (Invitrogen) s použitím NuPAGE® MES Running Buffer (Invitrogen Technologies). Elektroforéza probíhala 45 minut při 200V.

#### 4.4.2. Barvení gelu pomocí Coomassie G-250

Gel jsem barvila koloidní Coomassie G-250 (SimplyBlue™ Safe Stain, Invitrogen Life Technologies) za mírného třepání 60 minut. Po obarvení jsem gel promyla dvakrát v destilované vodě a jednou ve 20 % chloridu sodném, v obou případech 5 minut za

mírného třepání. Tím jsem vymyla z gelu nadbytečnou Coomassie barvu, která vytvářela tmavší pozadí. Nakonec jsem gel přes noc uchovala v lednici v 3% kyselině octové. Fotografii gelu jsem pořídila pomocí GS-800 kalibrovaným denzitometrem.

Proteiny v rozmezí 14-18 kDa jsem z gelu vypíchala a vložila do nových zkumavek s 200 µl destilované vody označených 1-11.



Obrázek 8. Bis-Tris gel NuPAGE. Vlevo očíslován marker (kDa). Rámečky znázorňují vybrané vzorky na analýzu hmotnostním spektrometrem. U jedinců B a D analýza neproběhla z důvodu vysoké koncentrace nanášky.

#### 4.4.3. LC-MS/MS analýza

Na tomto místě patří velké poděkování Zbyňkovi Zdráhalovi z Masarykovy univerzity za provedení LC-MS/MS analýzy.

Vzorky dodané v 200 µl destilované vodě byly naštípány na peptidy pomocí trypsinu. Trypsin štěpí proteiny specificky vždy v místě, kde se nachází zásaditá aminokyselina lysin nebo arginin. Dále následovala kyselá extrakce peptidů do zkumavky k LC-MS/MS analýze. K plynové chromatografii LC-MS/MS analýzy byl využit RSLCnano

(ThermoScientific) a následně hmotnostní spektrometr Orbitrap-Elite systém (ThermoScientific; technické údaje viz Tabulka 5).

Tabulka 5. Technické údaje k LC-MS/MS analýze.

Analýza	Čas	Rozlišení	m/Q	Systém
LC	50 min			RSLCnano
MS		60 000	400	Orbitrap-Elite
MS/MS		15 000	400	Orbitrap-Elite

MS/MS data byla prohledána pomocí programu Mascot proti UniRef100 databázi (taxonomie *Rodentia*; stažena 29. 12. 2013, obsahující celkem 421 577 proteinových sekvencí) a proti lokální databázi ("Misc") obsahující již dříve studované proteiny (u kterých byla tehdy prováděna *de novo* sekvenace peptidů). Vedle uvedených databází byla vždy paralelně prohledána také databáze známých proteinových kontaminant (cRAP; <http://www.thegpm.org/crap/>); v této databázi jsou i proteiny jako BSA (bovine serum albumine; protein velmi hojně používaný v proteomice), které mohou být přítomny v některých vzorcích - proteiny tohoto charakteru nebyly z reportů odstraněny a byly odlišitelné pomocí "-cRAP" označení za konkrétním proteinovým „accession“. Proteiny byly identifikovány na základě unikátních peptidů. V případě identifikace více proteinů na základě stejných unikátních peptidů tvořily tyto proteiny klastry. V reportu byly dále udány data jednotlivých proteinů jako molekulová hmotnost v kDa, „area“ představující průměr vrcholů z LC-MS analýzy tří nejvíce abundantních peptidů daného proteinu, počet peptidů, počet unikátních peptidů pro jednotlivé proteiny či klastry proteinů.

#### 4.5. Relativní kvantifikace exprese vybraných genů na hladině mRNA

Sekvenováním transkriptomu sekretu jsem získala sekvence genů, které jsou aktivně exprimovány v kaudálním orgánu. K porovnání jejich relativní mRNA abundance mezi jedinci jsem použila systém LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche) s příslušným hardwarem, softwarem a chemikáliemi. Principem této metody je specifická amplifikace sledovaného genu pomocí primeru v přítomnosti UPL sond. Jde v podstatě o klasickou PCR, ve které je amplifikace DNA detekována pomocí fluorescenčního signálu, který odpovídá počtu amplifikovaných vláken. Průběh exponenciální amplifikace DNA je v

„reálném čase“ zaznamenáván a převáděn do amplifikační křivky. Tato křivka má v ideálním případě esovitě zakřivený tvar a můžeme ji rozdělit do tří částí: a) „background“ fázi, kdy je produktu amplifikace tak málo, že přístroj ještě není schopen naměřit hodnoty fluorescence; b) exponenciální fáze během kterého množství produktu exponenciálně roste, trvá přibližně 4-8 cyklů; c) fázi plató, kdy se množství amplifikovaného produktu již nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní. Čím dříve se křivka dostane do exponenciální fáze, tím více startovních molekul bylo přítomno ve sledovaném vzorku. V exponenciální fázi je důležitý hlavně tzv. „Crossing point“ (Cp), bod, ve kterém začíná exponenciálně stoupat měřená fluorescence. Vzorky jsou pro přesnost a vyloučení chyby pipetování či náhodných efektů měřeny v triplicátech. Pro výpočet je pak použito průměrné Cp tří naměřených hodnot. Pokud standardní odchylka Cp je > 0,5, vzorek je pro další analýzy vyloučen. Cp cíleného genu ( $Cp_{\text{vzorek}}$ ) je vztahováno k expresi vybraného referenčního genu ( $Cp_{\text{ref}}$ ) podle vzorečku:

$$\text{Relativní exprese genu} = (E_{\text{Ref}})^{Cp_{\text{Ref}}} / (E_{\text{vzorek}})^{Cp_{\text{vzorek}}};$$

„E“ představuje efektivitu nasedání primeru referenčního a sledovaného genu ( $E_{\text{Ref}}$ ,  $E_{\text{vzorek}}$ ). K výpočtu relativní kvantifikace genu jsem použila referenční GAPDH (glyceraldehyd 3' fosfát dehydrogeánáza).

#### **4.5.1. Složky qPCR**

qPCR jsem prováděla v PCR destičce s 384 jamkami; objem jedné jamky byl 10  $\mu$ l. Složky směsi a sekvence primerů jsou znázorněny v Tabulce 6.

K návrhu primerů jsem využila vlastní sekvence získané pomocí transkriptomového sekvenování. Primery byly navrženy pomocí Universal ProbeLibrary Assay Design Center (<http://lifescience.roche.com>) se základním nastavením pro *Mus musculus*.

Tabulka 6. Složky směsi a sekvence primerů s příslušnými UPL sondami.

Složky PCR směsi	3,5 µl H <sub>2</sub> O (LC480 PCR grade, Roche),		
	0,2 µl forward primer		
	0,2 µl reverse primer		
	5 µl PCR mix (LC480 Probes Master, Roche)		
	0,1 µl sondy (UPL probe, Roche)		
	+ 1 µl cDNA vzorku		

Gen	Forward primer	Reverse primer	UPL sonda
FABP 5	AACTAGGAGTAGGACTGGCTCTCA	GATGATGCAGTCTGGTTTGG	#46
M-EN A 1	CACAGGACTAACCCCTCTGG	GTTGGATTTCCTGGTGTG	#7
LCN2	AAGGCCCTTCACCATGTA	TGGAGGTGACGTTGTAGCTG	#2
APOOL	TGGAAGATGCATATGTCTATCTGA	GCTGCAATCAGTCCCATT	#101
NRF 2	AAGCTTCAACCAGAAACACACT	ATGCCGGAGTCAGAGTCATT	# 98
GM11512	TGACTAGCTACATTACACGGAGGT	GTCCACCAACTGTGAATAAGAAGA	#78
Plin2	GCGACATGTACTCGGTGTTT	GGACTCCGTCAGACACTTCC	#16
Elovl4	AGACCAAAGCAATCCCAATG	ACTGCCAGGTGGATGTG	#63
Asprv1	CATGTGCCTGTGAGGTTCC	CCCATAAGGCTGGGTGAAC	#45
Scd1	TCACCACGTTCTTCATCGAC	CACCTTCTCCGGTCGTAGG	#46
Soat1	CCCACTGTTCCGGAATATCA	TTAAATACACAGCACCAGGAC	#92
S100a3	CCTCTGTCTCTACTGCCATGAGT	GGGATAGCATTGCCTTTGG	#110
Gm13340	AGACCGAAACCTAAACACAACCTT	CAGAATAGGTGTTGATAAAGAATTGG	#25
Rpl32	CCGGAAGTTTCTGGTCCAC	TGTGAGCAATCTCAGCACAGT	#17
RPLP1	TCAGTGAGCTGAACGGAAAA	CAGCAGAAACAGCCACAGC	#40
GAPDH	TCTGGCAAAGTGGAGATCG	GACCATGTAGTTGAGGTCGATG	#147

#### 4.5.2. Izolace RNA a přepis do cDNA

Izolace RNA byla provedena stejným postupem, jak bylo popsáno v kapitole 4.3.1. „Izolace RNA“. Pro qPCR jsem použila 6 samic a 6 samců *Apodemus flavicollis* (2 samice a 2 samci chyceni na lokalitě Žandov a Děčín, okres Děčín; ostatní jedinci chyceni v okolí Drnholce, okres Břeclav).

Sekret z kaudálního orgánu byl odebrán ihned po usmrcení cervikální dislokací. Během izolace RNA jsem inkubovala RNA 15 minut s DNasou I (Fermentas) pro odstranění případné DNA. Po izolaci jsem RNA přepsala do cDNA pomocí kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Postupovala jsem dle dodávaného standardního protokolu s opětovným ošetřením RNA DNasou I. Parametry qPCR jsou znázorněny v Tabulce 7.

qPCR probíhala na LightCycler480 SW 1.5 (Roche).



Tabulka 7. Parametry měření qPCR nastavené v softwaru LightCycler480 SW 1.5 (Roche).

	Cycles	Analysis model				
Preincubation	1	None				
Amplification	45	Quantification	Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
			95	None	00:00:10	4,8
			60	Single	00:00:30	2,5
			72	None	00:00:01	4,8
Cooling	1	None				

#### 4.5.3. Zpracování výsledků

Naměřené a vypočítané hodnoty relativních expresí genů u 12 jedinců (6 samic a 6 samců *A. flavicollis*) jsem analyzovala pomocí programu R studio 7.2. Pro analýzu rozdílů exprese vybraných genů u 12 jedinců jsem zvolila statistickou analýzu ANOVA. Pro porovnání relativní mRNA abundance mezi pohlavím jsem zvolila Tukey HSD test.

## 5. Výsledky

### 5.1. Transkriptomová část

Pomocí 454 pyrosekvenování (GS Junior Roche) jsem získala repertoár transkripčně aktivních genů kaudálního orgánu. V čase psaní této diplomové práce nebyl podobný výzkum na kaudálním orgánu publikován. Použita byla cDNA kaudálního orgánu samce *Apodemus flavicollis*, u kterého je kaudální orgán vyvinut nejvíce ze všech druhů žijících na území České republiky. Tabulka 8 ukazuje statistické výsledky sekvenování.

Tabulka 8. Statistické údaje sekvenování (GS Junior, Roche).

Celkový počet jamek	302 764
Jamky se sekvencí adaptoru	291 930
<b>Jamky prošlé filtry</b>	<b>149 783</b>
Celkový počet bází	63 000 565
Průměrná délka	420.61
Standardní odchylka v délce	147.14
Nejdelší čtená sekvence	947
Nejkratší čtená sekvence	40
Median délky čtených sekvencí	483.0

Transkriptomové sekvenování sekretu kaudálního orgánu dopadlo nadprůměrně dobře. Filtry prošlo 149 783 čtení (viz Tabulka 8 - Jamky prošlé filtry). To je ve srovnání s hodnotou udávanou výrobcem ~100 000 čtení/běh uspokojující výsledek. Průměrná délka čtení v mém běhu (420,61 bází) v podstatě odpovídá údaji o délce čtení, které udává výrobce (~400 bází). Výsledný soubor čtených sekvencí jsem skládala do kontigů s využitím programu Reference Mapper. Tento program mapoval jednotlivá čtení na transkriptomovou databázi cDNA *Mus musculus*, při němž využil 84 215 čtení (asi 56,2% z celkového počtu čtení) a vytvořil 12 845 kontigů. Dále program vytvořil fasta soubor (formát.fna), ve kterém ke každému kontigu přiřadil kódové označení referenčního transkriptu, na který dané čtení mapoval, a počet čtení, které k vytvoření kontigu využil. Kódové označení kontigů jsem využila k přiřazení MGI názvu a symbolu genů pomocí

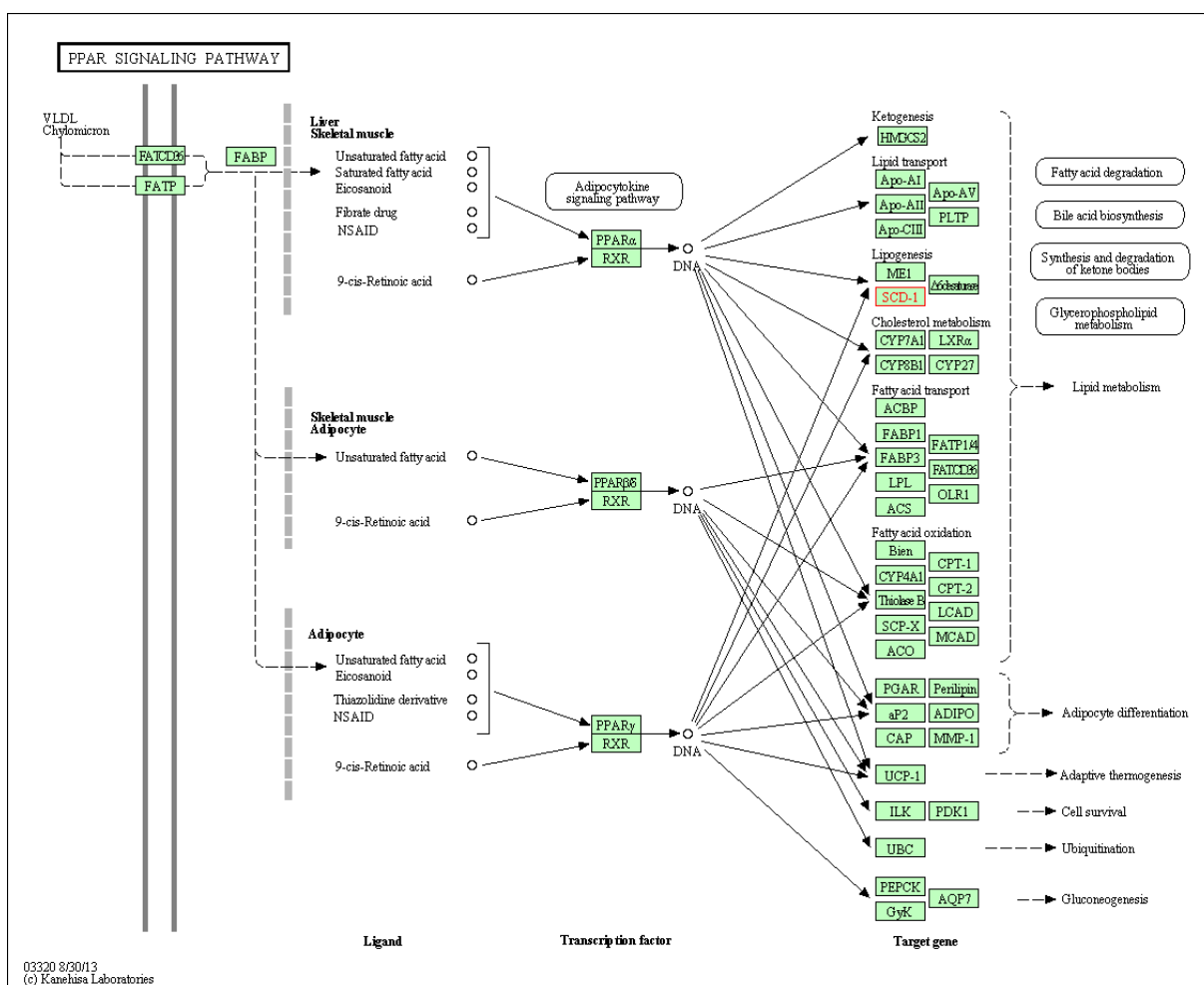
nástroje Biomart (<http://www.ensembl.org/biomart/martview>). Celkový počet získaných genů byl 8 282.

Namapované geny byly zpracovány ve webové aplikaci KEGG Mapper (<http://www.genome.jp/kegg/>), jehož výstupem byla tabulka a diagram metabolických drah. Celkově se jedná o 221 drah. V Tabulce 9 je seznam vybraných metabolických drah, který poukazuje na aktivitu kaudálního orgánu. Obrázek 9 pak zobrazuje KEGG mapu PPAR signaling pathway, která je součástí metabolismu lipidů a dalších metabolických drah.

Tabulka 9. Metabolické dráhy kaudálního orgánu s počtem genů účastnících se těchto drah. V posledním sloupci je uveden počet čtení genů participujících v dané dráze.

ID KEGG mapy	Metabolická dráha	Počet genů	Počet čtení
mmu01100	Metabolic pathways	582	8858
mmu03320	PPAR signaling pathway	29	2213
mmu01212	Fatty acid metabolism	33	1869
mmu04152	AMPK signaling pathway	61	1749
mmu00062	Fatty acid elongation	15	1733
mmu01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	15	1495
mmu04612	Antigen processing and presentation	43	901
mmu00100	Steroid biosynthesis	12	816
mmu00830	Retinol metabolism	23	634
mmu04915	Estrogen signaling pathway	37	623
mmu04919	Thyroid hormone signaling pathway	53	604
mmu05100	Bacterial invasion of epithelial cells	36	593
mmu00561	Glycerolipid metabolism	26	471
mmu04970	Salivary secretion	25	402
mmu04978	Mineral absorption	23	387
mmu00071	Fatty acid degradation	26	386
mmu00900	Terpenoid backbone biosynthesis	18	352
mmu00600	Sphingolipid metabolism	20	301
mmu00590	Arachidonic acid metabolism	32	219
mmu04730	Long-term depression	21	200
mmu00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism	18	171
mmu04918	Thyroid hormone synthesis	21	169
mmu04975	Fat digestion and absorption	11	132
mmu04961	Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	14	131
mmu00140	Steroid hormone biosynthesis	13	97
mmu00591	Linoleic acid metabolism	15	93

Obrázek 9. KEGG mapa dráhy PPAR signaling pathway, která se podílí na metabolismu lipidů či diferenciaci adipocytů. Tato dráha je příkladem dráhy probíhající v kaudálním orgánu. Zajímavá je i z důvodu červeně zvýrazněného genu *Scd1*, který je dále zkoumán ve spojitosti s pohlavními rozdíly jeho relativní mRNA abundance (viz 5.3.1. „Ověření exprese pomocí qPCR“ a „Diskuze“).



Sekvenační data byla dále zpracována pro Gene Ontology analýzu (<http://www.geneontology.org/>) pomocí webové aplikace DAVID Bioinformatics Database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). V příloze je seznam Gene Ontology kategorizovaný podle molekulárních funkcí, Benjamini korekce ( $p < 0,05$ ).

## 5.2. Proteomická analýza

V proteomické části jsem využila 1-D NuPAGE® Novex Midi gel s LC-MS/MS analýzou.

### **5.2.1. 1-D elektroforéza**

Pomocí 1-D NuPAGE® Novex Midi gelu 5 (resp. 3) jedinců jsem získala přehled proteinů sekretu kaudálního orgánu. Vysoká nanáška dvou samců znemožnila jejich analýzu. U samce C jsem provedla ředící řadu. K analýze jsem vybrala oblast proteinů o velikosti 14-18kDa kvůli předpokladu lipokalinů v sekretu. Z této oblasti jsem pak na analýzu vybrala nejintenzivnější pruhy každého jedince. Repertoár proteinů proto není u jedinců stejný, ale liší se. Celkově jsem analyzovala 11 vzorků.

### **5.2.2. Výsledky analýzy hmotnostního spektrometru**

Proteiny vybrané velikosti byly analyzovány metodou LC-MS/MS a identifikovány na základě tzv. unikátních peptidů. Ovšem repertoár proteinů, které jsem dostala z analýzy 1-D gelu, nebyl popsán jasně, ale proteiny byly shromážděny do klastrů, které zahrnovaly proteiny identifikované na základě stejných unikátních peptidů, přičemž v sekretu se může nacházet jeden z proteinů z této skupiny, ale i proteinů více. Tento problém je většinou vyřešen identifikací proteinu větším počtem unikátních peptidů.

Kaudální orgán mě zajímal především ve spojitosti s chemickou komunikací. Proto jsem se zaměřila na proteiny, které by mohly tuto komunikaci zprostředkovávat. Jde o velkou proteinovou rodinu lipokalinů.

### **5.2.3. Lipokaliny kaudálního orgánu**

Tabulka 10 zobrazuje seznam lipokalinů, které byly detekovány na hmotnostním spektrometru v sekretu z kaudálního orgánu.

RBP1 (retinol binding protein 1) byl u jedince A detekován ještě s dalšími 12 proteiny. V 9 případech šlo o RBP1 identifikovaném na jiných druzích, ve 3 případech se jednalo o identifikaci retinol binding protein 2 (RBP2).

RBP4 (retinol binding protein 4) nalezený u jedince A byl v klastru se čtyřmi stejnými proteiny, ovšem překryv sekvence peptidu se sekvencí proteinu nebyl vyšší než 5%. Stejná situace nastala i u jedince C.

FABP5 (fatty acid binding protein, epidermal) se objevoval v klastrech pouze s identifikací FABP5 u jiných druhů, spolehlivost identifikace tohoto proteinu je tedy

vysoká. FABP4 u jedince C s identifikací na základě 2 unikátních peptidů bylo v klastru dalších 11 proteinů, ovšem stejně jako u FABP5 šlo o stejný protein identifikovaný u různých druhů.

Lcn 5 (epididymal-specific lipocalin – 5) byl nalezen u jedince C. Nevytvářel klastr s dalšími proteiny, překryv sekvence peptidu se sekvencí proteinu činil 19%.

Srovnáním peptidů proti lokální databázi ("Misc") byl pouze u jedince E na základě jednoho unikátního peptidu detekován OBP6 (odorant binding protein 6). V případě OBP6 bylo v klastru dalších 20 proteinů skupiny OBP. „Area“ analyzovaného peptidu byla rovna 0.00E+00, v kaudálním orgánu je tedy jen v minimální koncentraci.

Tabulka 10. Přehled analyzovaných lipokalinů v sekretu kaudálního orgánu u tří jedinců. Spolehlivost výsledků se odráží na počtu unikátních peptidů.

Název lipokalinu	Zkratka názvu	Počet unikátních peptidů		
		Jedinec A	Jedinec C	Jedinec E
Fatty acid binding protein, epidermal	FABP5	1	4	5
Cellular retinoic acid binding protein 1	cRABP 1	2	5	4
Fatty acid binding protein, adipocyte	FABP4	-	4	2
Retinol binding protein 1	RBP 1	1	1	4
Retinol binding protein 4	RBP4	1	1	-
Retinol binding protein 7	RBP7	-	-	2
Epididymal-specific lipocalin-5		-	3	-
Odor binding protein 6	OBP6	-	1	-

#### 5.2.4. Abundantní proteiny sekretu

V Tabulce 11 je přehled deseti nejvíce abundantních proteinů každého jedince za použití filtru „proteiny identifikované  $\geq 3$  unikátní peptidy“. V tabulce abundantních proteinů se u jedinců C a E objevuje i lipokalin FABP5. Tento protein se zdá být důležitou molekulou kaudálního orgánu, neboť se v něm objevuje jak na úrovni genu, tak na úrovni proteinu. V kapitole „Ověření exprese pomocí qPCR“ se nacházejí výsledky měření relativní exprese potencionálního genu toho proteinu.

Jak bylo již řečeno 1-D elektroforéza není k identifikaci proteinů úplně ideální. Jeden pruh na gelu v sobě obsahuje desítky proteinů či jejich fragmenty. Pro přesnější identifikaci bude nutná 2-D elektroforéza. Z vlastní zkušenosti s proteiny sekretu kaudálního orgánu ovšem mohu říci, že pozitivní výsledek 1-D elektroforézy je velmi

uspokojující. Neboť práce s materiálem plným lipidů a příprava vzorku na elektroforézu nemusí vždy vést k úspěchu.

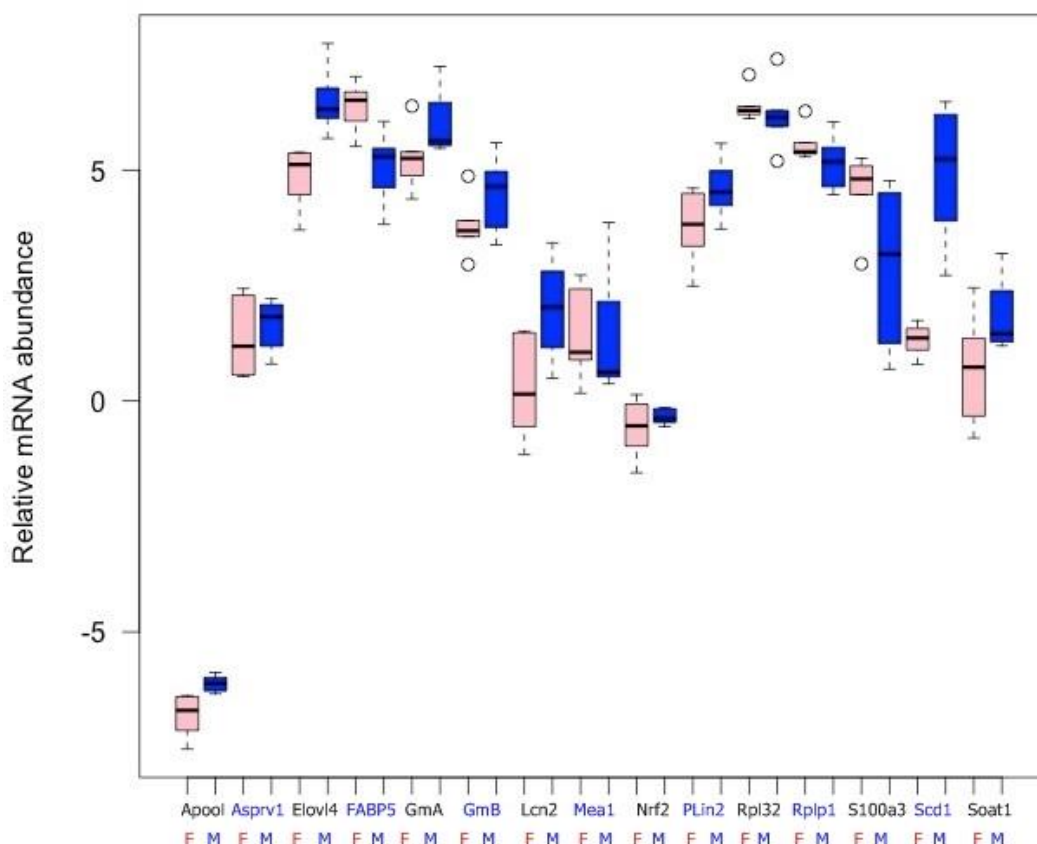
Tabulka 11. Přehled 10 nejvíce abundantních proteinů v sekretu analyzovaných jedinců. Seřazeno dle „area“. Tato hodnota poměrně dobře koreluje s absolutním množstvím proteinu ve vzorku (Grossmann et al., 2010).

Seznam abundantních proteinů		
Jedinec A	Jedinec C	Jedinec E
Hemoglobin subunit beta n=1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC679994 n=1	Beta globin n=1
PREDICTED: uncharacterized protein LOC679994 n=1	PREDICTED: histone H2A type 1-like n=1	Microsomal glutathione S-transferase 1 n=3
Histone H4 n=1	Beta-globin n=1	Fatty acid-binding protein, epidermal n=2
PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like n=1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC679994 n=1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 n=1
ADP-ribosylation factor 2 n=1	Hemoglobin subunit beta n=1	PREDICTED: translocon-associated protein subunit delta-like n=1
Histone H2A n=1	Galectin n=2	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7-like n=1
Receptor expression-enhancing protein 5 n=1	Microsomal glutathione S-transferase 1 n=3	Protein S100a16 n=2
ADP-ribosylation factor 4 n=4	Fatty acid-binding protein, epidermal n=2	Transthyretin n=1
Protein LOC100912024 (Fragment) n=1	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like n=1	Myelin protein P0 n=1
Transmembrane protein 109 n=1	ADP-ribosylation factor 2 n=1	PREDICTED: small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 n=1

### 5.3. Ověření exprese pomocí qPCR

454 sekvenováním transkriptomu kaudálního orgánu nemodelového druhu *Apodemus flavicollis* jsem za využití dalších programů získala seznam kontigů (genů). Rozhodla jsem se ověřit míru relativní exprese několika kontigů (potencionálních genů; dále jen „geny“) s nejvyšším počtem čtení, dále ověřit expresi kontigů namapovaných na geny lipokalinů, Mea 1 a Nrf2 (dále jen „geny“). Exprese jednotlivých genů jsem vztáhla k expresi referenčního genu GAPDH (podle standardní metody maxima druhé derivace, viz Obrázek 10). Zajímalo mě, zda je exprese jednotlivých genů závislá na pohlaví. Pro analýzu rozdílů

relativní mRNA abundance vybraných genů u 12 jedinců jsem zvolila statistickou analýzu ANOVA.



Obrázek 10. Relativní mRNA abundance genů. Na ose X jsou naneseny jednotlivé geny, na ose Y je jejich relativní mRNA abundance (LOG hodnota). Abundance referenčního genu je rovna nule (LOG hodnota). Modré boxy jsou relativní exprese samců (M), růžové jsou hodnoty samic (F). Geny Gm11512 a Gm13340 jsou na grafu označeny GmA, resp. GmB.

### 5.3.1. mRNA abundance závislá na pohlaví

Relativní expresi genů jsem změřila pro každého jedince zvlášť. Nejnižší relativní exprese byla naměřena u lipokalinu apolipoprotein O-like. Srovnatelná relativní abundance s referenčním genem se u některých samic objevuje u genu Lcn2 a Soat1. U jedinců obou pohlaví se pak na hladině abundance referenčního genu objevuje i gen Nrf2. Z grafu je viditelná variabilita mezi jedinci v mRNA abundanci genů. Největší variabilita mezi jedinci je naměřená u samčího genu S100a3.



Relativní mRNA abundanci jednotlivých genů jsem porovnávala mezi jedinci opačného pohlaví s poměrem 6 samic ku 6 samcům *Apodemus flavicollis*. Pomocí relativní abundance jedinců obou pohlaví jsem pomocí Tukey HSD testu vypočítala závislost abundance genů na pohlaví. Celková abundance sledovaných genů je signifikantně vyšší u samců než u samic ( $p=0.000030600$ ). Abundance jednotlivých genů je signifikantně závislá na pohlaví pouze u genu Scd1 ( $p=0$ ) s vyšší abundancí u samců než samic, viz Tabulka 12.

Tabulka 12. Výsledky Tukey HSD testu vlivu pohlaví na celkovou mRNA abundanci genů a genů jednotlivě.

Tukey HSD test	Výsledné p
Pohlaví	0.000030600***
M:Scd1-F:Scd1	0
M:Lcn2-F:Lcn2	0.1106196
M:S100a3-F:S100a3	0.180007
M:Elovl4-F:Elovl4	0.184593
M:Fabp5-F:Fabp5	0.6600225
M:Soat1-F:Soat1	0.8683622
M:Plin2-F:Plin2	0.9972887
M:Gm11512-F:Gm11512	0.9996368
M:Gm13340-F:Gm13340	0.9997477
M:Apoal-F:Apoal	0.9998901
M:Asprv1-F:Asprv1	1
M:Mea1-F:Mea1	1
M:Nrf2-F:Nrf2	1
M:Rpl32-F:Rpl32	1

## Diskuze

Pomocí sekvenování nové generace, proteinové elektroforézy a následného ověření relativní mRNA abundance některých genů jsem se pokusila o první charakterizaci kaudálního orgánu. Z výsledků je jasné patrné, že kaudální orgán je aktivním orgánem. Ostatní interpretace výsledků jsou na hypotetické úrovni.

Předpokládaná role kaudálního orgánu myšic rodu *Apodemus* je chemická komunikace (Stoddart & Sales, 1985). Jaké ale molekuly se této komunikace účastní?

Důležitou složkou dle výsledků kaudálního orgánu se zdají být mastné kyseliny. V seznamu KEGG map se objevují metabolické dráhy s nimi spojené. Kaudální orgán by tedy mohl mít podobný charakter jako subkaudální žláza jezevců (*Meles meles*) či žlázy uložené v tříslivé oblasti králíků (*Oryctolagus cuniculus*). U jezevců je obsah subkaudální žlázy tvořen hlavně nenasycenými mastnými kyselinami a vodou (Gorman et al., 1984). Důležitou funkci u jezevců v této žláze hraje bakteriální fauna, která rozkládá primární produkty žláz (Albone et al., 1978). Během výzkumu na diplomovou práci jsem se pokoušela izolovat z kaudálního orgánu myšic bakteriální DNA, ovšem výsledky zatím ukazují malou koncentraci bakteriální DNA.

Přítomnost mastných kyselin se předpokládá mimo jiné i v potních žlázách uložených v blízkosti mazových žláz v tříslích králíka divokého. V samotné mazové žláze jsou pak obsaženy mono-, di- a triglyceridy. (Goodrich & Mykytowicz, 1972). Triglyceridy jsou předpokládány i v kaudálním orgánu myšic rodu *Apodemus* (Stoddart & Sales, 1985).

V kaudálním orgánu dále probíhá metabolismus kyseliny linolové a arachidonové (viz KEGG mapy, Kapitola 5. 1. „Transkriptomová část“). Kyselina linolová je pro živočichy esenciální (tzn. živočichové nejsou schopni ji syntetizovat), je tedy přijímána v potravě. Zároveň je i prekurzorem kyseliny arachidonové. Lohner et al., 2012 provedli výzkum v pohlavních rozdílech obsahu nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem v lidské tkáni. V adipózní tkáni zjistili vyšší obsah kyseliny linolové a dihomog-linoleové u žen než u mužů. Muži měli oproti ženám zase vyšší obsah kyseliny arachidonové a g-linoleové. Mohly by být stejné pohlavní rozdíly v obsahu mastných kyselin i v kaudálním orgánu myšic rodu *Apodemus* a hrát tak roli v rozlišení pohlaví? Tato otázka je nyní nezodpovězená a bude předmětem dalších výzkumů.

FABP5 (fatty acid binding protein 5) je protein patřící mezi lipokality se schopností vazby dlouhých mastných kyselin.  $\beta$ -barrel zajišťující vazbu FABP5 je tvořen 10 antiparalelními listy (Flower, 1996). FABP5 se v mém výzkumu objevuje jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu. Jakou tedy hraje roli tento lipokalin v kaudálním orgánu (viz dále)?

Kyselina retinová a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem regulují genovou transkripci skrz aktivaci nukleárních receptorů, jako jsou receptory kyseliny retinové (RAR) a peroxisome proliferation-activated receptory (PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ ; Tan et al., 2002). Aktivované PPAR $\alpha$  receptory podporují oxidaci mastných kyselin a syntézu ketonových tělísek, PPAR $\gamma$  receptory zajišťují diferenciaci preadipocytů v adipocyty a stimulují ukládání triglyceridů. PPAR $\delta$  jsou všudypřítomné a v nedostatku PPAR $\alpha$  mohou také podporovat oxidaci mastných kyselin. Ligandy těmto receptorům jsou mastné kyseliny a kyselina retinová (Tan et al., 2002). Kyselina retinová vzniká z retinolu (vitamín A) a je navázaná buď na CRABP2 (celulární retinoic acid binding protein 2), nebo v případě nepřítomnosti tohoto proteinu je vázána na FABP5. Tyto dva proteiny totiž sdílí vazebnou homologní strukturu (Sugawara et al., 2012) a jejich exprese spolu úzce souvisí. V případě nízké koncentrace FABP5 je v tkáni vyšší koncentrace CRABP2 a naopak. U myši s vyřazeným genem pro FABP5 byla detekována silná redukce mazových žláz s nepozměněnou strukturou vlasových folikulů (Sugawara et al., 2012). Je tedy FABP5 spolu s dalšími molekulami odpovědná za fenotypové změny na začátku období páření, kdy samcům tento kaudální orgán mnohem více zbytní?

Ve spojitosti s touto otázkou mě během zpracování mých výsledků zaujal počet čtení z 454 sekvenování a relativní mRNA abundance genu ve sledované tkáni. V případě FABP5 s počtem čtení 177 byla totiž relativní mRNA abundance na stejné hladině jako relativní mRNA abundance genu GM11512 s počtem čtení 1 101, což je 6x více než počet čtení FABP5 (Gm11512-FABP5:  $p_{\text{samci}} = 0.9909248$ ). Otázkou je tedy, zda počet čtení z výsledků 454 sekvenování čistě nekoreluje s relativní mRNA abundancí genů, nebo zda nehrají roli jiné faktory (například sezóna). V tomto případě je na místě zmínit právě období usmrcení jedinců. Samec *Apodemus flavicollis* využitý na 454 sekvenování byl usmrcen na začátku října, kdežto samci pro relativní kvantifikaci byli usmrceni na začátku července. Období by mohlo tedy hrát důležitou roli, neboť v období páření je kaudální orgán větší a je pravděpodobně aktivnějším orgánem než na konci podzimu. Je tedy

možné, že koncentrace proteinu FABP5 je na jaře vyšší než na podzim. Důležitou poznámkou v tomto kontextu je i čas jedince strávený v chovech. Během výzkumu na diplomovou práci jsem totiž zjistila, že kaudální orgán u samců v chovech během roku neprodělává fenotypové změny jako orgán volně žijících jedinců. Zda za to může nepřírozený typ potravy či jiné faktory (např. potlačení sociálních interakcí) bude předmětem dalších výzkumů.

PPAR signalizační dráha dále souvisí s genem *Scd1*, jehož relativní mRNA abundance je v kaudálním orgánu signifikantně závislá na pohlaví. Tento gen kóduje enzym *Scd1* podílející se na syntéze mastných kyselin s jednou dvojnou vazbou (Ntambi et al., 2002). Myši s vyřazeným genem pro *Scd1* vykazovaly oproti divokým jedincům zvýšenou hladinu syntézy enzymů pro oxidaci mastných kyselin, sníženou syntézu enzymů pro syntézu lipidů a snížené ukládání lipidů (Ntambi et al., 2002, Dobrzyn et al., 2004). Různé hladiny exprese tohoto genu by tedy mohly souviset s rozdíly v míře vývinu kaudálního orgánu mezi jedinci opačného pohlaví (Stoddart & Sales, 1985). S ohledem na mé výsledky je možné, že kaudální orgán je více vyvinut u samců z důvodu vyšší relativní mRNA abundance tohoto genu a tedy vyšších účinků enzymu *Scd1*. *Scd1* a FABP5 jsou součástí PPAR signalizační dráhy, je tedy možné, že se spolupodílí na fenotypovém projevu kaudálního orgánu.

Svou expresí v kaudálním orgánu mě zaujal gen *Mea1* (male-enhanced antigen 1). Male-enhanced antigen 1 je totiž exprimován během pozdní fáze spermatogeneze v testes (Ohinata et al., 2002). Tento gen má několik sestřihových variant značených „a-f typ“. D-typ je exprimován i v dalších tkáních kromě testes. Jeho detekce na úrovni mRNA byla zaznamenána v mozku, srdci, ledvinách či játrech, ovšem na úrovni proteinu detekován v těchto tkáních nebyl (Ohinata et al., 2002). Molekulární hmotnost proteinu *Mea1* variant genů je okolo 18,5kDa. Na 1D gelu kaudálního orgánu byly analyzovány proteiny o velikosti 14-18kDa. Je pravděpodobné, že horní pruh na gelu u jedince C3 zasahuje až do oblasti velikosti tohoto proteinu, *Mea1* ovšem detekován nebyl. Je tedy nejasné, jakou funkci v tkáních, ve kterých je přepisován, ale ne překládán, vlastně tento gen zaujímá.

Jedna z navrhovaných funkcí kaudálního orgánu je značení teritoria (Niethammer, 1969). Práce, které by toto tvrzení potvrzovaly, ovšem nebyly nikdy publikovány. Teritorialita zástupců *Apodemus* se druh od druhu liší. Například *Apodemus uralensis* je velmi mírumilovná myšice. Samci vůči sobě nejsou agresivní ani v období páření. Není

proto problém chovat v jedné kleci i nepříbuzné jedince (Suchomelová & Frynta, 2000). Teritorialita tohoto druhu nebude tedy příliš vysoká. V tomto případě by tedy kaudální orgán nehrál takovou roli a nemusel by být vyvinut ve velké míře. Tak tomu doopravdy i je. Myšice *Apodemus uralensis* má kaudální orgán vyvinut nejméně ze čtyř druhů žijících na území České republiky. Myšice křovinná oproti myšici malooké je poměrně teritoriální druh. Teritorium samce *Apodemus sylvaticus* v období páření zaujímá rozlohu až 1,44 ha (Tew & Macdonald, 1994). Značení teritoria by probíhalo pokládáním kaudálního orgánu na spadlé větvičky či obecně na předměty nacházející se na zemi. Ovšem takovéto zanechání sekretu není pravděpodobně cílené (Stoddart & Sales, 1985). Ověření této hypotézy bude předmětem dalšího výzkumu.

Velmi zajímavou navrhovanou funkcí kaudálního orgánu je funkce spojená s kopulací. Jak již bylo řečeno, kaudální orgán v období páření mnohem více zbytní a je citlivý na sebemenší tlak. Je tedy velmi pravděpodobné, že během kopulace zanechá samec na samici svůj sekret. Prekopulační fází u myšic rodu *Apodemus* je tzv. allogrooming (tj. vzájemné čištění srsti; Stopka & Macdonald, 1998), během kterého se samec snaží dostat k samičím genitáliím a provést tzv. naso-genitální kontakt (Stopka & Macdonald, 1998; Stopka & Macdonald, 1999), aby zjistil, zda je tedy samice receptivní. V případě, že by byla samice již pokryta například dominantnějším samcem a označená tak jeho sekretem, mohl by potencionální nápadník zachytit tuto značku a o samici se více nepokoušet. Na jakém principu by ale značka zaujala samce, aby o samici ztratil zájem? Je možné, že roli hrají mastné kyseliny, jak bylo psáno výše, nebo by v kaudálním orgánu samců mohlo docházet k syntéze molekuly s podobnou funkcí, jako má 7-tricosen u samců *Drosophily*. Tato molekula je samčím feromonem pro ostatní samce odpuzivá, samci se tak navzájem rozeznají. V případě vypnutí genu pro syntézu tohoto feromonu se samci pokoušeli kopulovat s takto modifikovanými samci (Billeterer et al., 2009). Kdyby tedy samci myšice rodu *Apodemus* ve svém kaudálním orgánu nosili podobnou molekulu, mohli by takto odpuzovat a mást případné konkurenční samce.

Z diskuze je patrné, že první výzkumy kaudálního orgánu přinesly více otázek než odpovědí. K úplnému pochopení funkce kaudálního orgánu bude nutné provést ještě mnoho takových výzkumů s hlavním zaměřením na behaviorální studie.

## Závěr

- Pomocí transkriptomového sekvenování jsem získala přehled transkripčně aktivních genů kaudálního orgánu.
- Pomocí proteomické analýzy jsem ověřila přítomnost lipokalinů v kaudálním orgánu. Nejvyšší zastoupení z těchto proteinů měl FABP5, který by mohl hrát roli během fenotypových změn kaudálního orgánu napříč sezónou. Tento protein je v kaudálním orgánu detekován i na úrovni mRNA.
- Pomocí qPCR jsem porovnála relativní mRNA abundanci určitých genů mezi jedinci opačného pohlaví. Celková abundance sledovaných genů byla signifikantně vyšší u samců než u samic, což odráží větší aktivitu kaudálního orgánu samců. Na úrovni jednotlivých genů byla signifikantně závislá na pohlaví pouze relativní mRNA abundance u genu *Scd1* s vyšší abundancí u samců než samic. Tento gen je další potenciaální molekula hrající roli ve fenotypu kaudálního orgánu podobně jako FABP5. Tyto dvě molekuly jsou součástí PPAR singalizační dráhy.
- Svou roli by tento orgán mohl zastupovat i v sociálních interakcích během období rozmnožování. Kaudální orgán je v tomto období u samců velmi zbytnělý a citlivý na jakýkoliv tlak. Během kopulace by tedy mohl samec na samici zanechat svůj sekret. V této značce by tak byla informace pro případné konkureční samce, že je samice již pokryta třeba i dominantnějším samcem.

## **Literatura**

- Albone, E. S. et al., 1978.** Bacterial action and chemical signaling in the red fox (*Vulpes vulpes*) and other mammals, s. 78–91, in R. W. Bullard (ed.). *Flavour Chemistry of Animal Foods*. ACS Symposium Series 67. American Chemical Society, Washington, D. C.
- Aulagnier, S. et al., 2008.** Mammals of Europe, North Africa and the Middle East. vydavatelství A. & C. Black.
- Bellringer, J. F., Pratt, H. P. M. & Keverne, E. B., 1980.** Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 59, s. 223-228.
- Billeterer, J. et al., 2009.** Specialized cells tag sexual and species identity in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 461, Pages 987–991.
- Borg Karlson, A. K., 1990.** Chemical and ethological studeis of pollination in the genus *Ophrys* (Orchideadea). *Phytochemistry*, 29, s. 1359-1387.
- Bowers, J. M. & Alexander, B. K., 1967.** Mice: Individual Recognition by Olfactory Cues. *Science*, Volume 158, Pages 1208-1210.
- Brechbühl, J., Klaey, M. & Broillet, M. Ch., 2008.** Grueneberg Ganglion Cells Mediate Alarm Pheromone Detection in Mice. *Science*, Volume 321, Pages 1092-1095.
- Brook, F. A., 1984.** Studies of ovarian structure and fiction in the wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *PhD thesis*, University of Oxford.
- Brownlee, R. G. et al., 1969.** Isolation, Identification and Function of the Chief Component of the Male Tarsal Scent in Black-tailed Deer. *Nature*, 221, s. 284-285.
- Bruce, H.M., 1959 cit podle Kelliher, K. R. & Wersinger, S. R., 2009.** Olfactory Regulation of the Sexual Behavior and Reproductive Physiology of the Laboratory Mouse: Effects and Neural Mechanisms. *ILAR journal*, 50(1), s. 28-42.
- Buck, L. & Axel, R., 1991.** A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), s. 175–187.
- Buesching, C. D. & Macdonald, D. W., 2001.** Scent-marking behaviour of the European badger (*Meles meles*): Resource defence or individual advertisement? In A. Marchlewska-Koj, J. J. Lepri, & Müller-Schwarze, D. (eds.). *Chemical Signals in Vertebrates*. Plenum Press, Oxford, in press.
- Buesching, C. D., Waterhouse, J. P. & Macdonald, D. W., 2002.** Gas chromatographic analyses of the subcaudal gland secretion of the European badger (*Meles meles*); Part I: Chemical differences related to individual parameters. *Journal of Chemical Ecology*, 28, s. 41–56.

- Buesching, C. D., Stopka, P. & Macdonald, D. W., 2003.** The social fiction of allo-marking in the European badger (*Meles meles*). *Behaviour*, 140, s. 965.
- Burns, R. B.; 1979.** Histological and immunological studies on the fowl lacrimal gland following surgical excision of Harder's gland. *Research in veterinary science*, 27(1), s. 69-75.
- Butenandt, A. et al., 1959.** Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*, Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforsch*, 14, s. 283–284.
- Clarke, J. R., 1985.** The reproductive biology of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). *Symp. Zool. Soc. London.*, 55, s. 33–59.
- Dlouhy, S. R., Taylor, B. A. & Karn, R. C., 1987.** The genes for mouse solivary androgen-binding protein (ABP) subunits alpha and gamma are located on chromosome 7. *Genetics*, 115, s. 535.
- Dobrzyn, P. et al., 2004.** Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 101, s. 6409–6414.
- Dulac, C. & Torello, A. T.; 2003.** Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Neuroscience*, 4, s. 551-562.
- Egid, K. & Brown, J. L., 1989.** The major histocompatibility komplex and fiale mating preferences in mice. *Animal behaviour*, 38, s. 548
- Ewer,R.F., 1968.** Etology of mammals. Vydavatelství Elek Science.
- Fabre, J.H. podle Hecker, E, 2004.** Pheromone in insect – on the first stages of discovery of chemical communication between individuals. *Special issue*. 6(2), s. 66-72.
- Falk, K. & Rotzschke, O., 1993.** Consensus motifs and peptide ligands of MHC class I molecules. *Seminars in immunology*, 5, s. 81–94.
- Flower, D. R., North, A. C.T. & Attwood, T. K., 1993.** Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Science*, 2, s. 753-761.
- Flower, D.R., 1996.** The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal*. 318. 1-14.
- Goodrich, B. S. & Mykytowycz, R., 1972.** Individual ans sex differences in the chemical composition of the pheromone-like substance from the skin glands of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Journal of Mammalogy*. 53, s. 540-548.
- Gorman, M. L., 1982.** Social differences in the subcaudal scent gland secretion of *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae). *Journal of Zoology*, 198, s. 353–362.
- Gorman, M. L., Kruuk, H. & Leitch, A., 1984.** Social functions of the sub-caudal scent gland secretion of the European badger (*Meles meles*) (Carnivora: *Mustelidae*). *Journal of Zoology*, 203, s. 549–559.



- Grossmann, J. et al., 2010.** Implementation and evaluation of relative and absolute quantification in shotgun proteomics with label-free methods. *Journal of Proteomics*, 73, s. 1740–1746.
- Halpern, M., 1987.** The Organization and Function of the Vomeronasal System. *Annual Review of Neuroscience*, 10, s. 325–362.
- Hurst, J. L. et al., 1998.** Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Animal Behaviour*, 55, s. 1289–1297.
- Hwang, J. M. et al., 1997.** The microevolution of mouse salivary androgen-binding protein (ABP) paralleled subspeciation of *Mus musculus*. *Journal of heredity*, 88, s. 93.
- Charles, A., 1959.** An electron microscopic study of the human axillary apocrine gland. *Journal of anatomy*, 93, s. 226–232.
- Imai, T. & Sakano, H., 2009.** Odorant receptor gene choice and axonal projection in the mouse olfactory system. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 47, s. 57–75.
- Jenkinson, D. M. et al., 1985.** Comparative studies of the ultrastructure of the sebaceous gland. *Tissue & Cell*, 17, s. 683–698.
- Karlson P. & Luscher M., 1959.** Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, s. 55–56
- Karn, R.C., 1998.** Steroid binding by mouse salivary proteins. *Biochemical genetics*, 36, s. 105–117.
- Kavaliers, M. & Colwell, D. D., 1995.** Discrimination by feral mice between the odour of parasitized and non-parasitized males. *Proc. Biol.Sci.*, 261, s. 31–35.
- Keller, M. et al., 2009.** The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 200, s. 268–276.
- Kelliher, K. R. & Wersinger, S. R., 2009.** Olfactory Regulation of the Sexual Behavior and Reproductive Physiology of the Laboratory Mouse: Effects and Neural Mechanisms. *ILAR journal*, 50(1), s. 28–42.
- Kimoto, H. et al., 2005.** Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, 437, s. 898–901.
- Kimoto, H. et al., 2007.** Sex- and Strain-Specific Expression and Vomeronasal Activity of Mouse ESP Family Peptides. *Current Biology*, 17 (21), s. 1879–1884.
- Laukaitis, CH. M., Critser, E. S. & Karn, R. C., 1997.** Salivary androgen-binding protein (ABP) mediated sexual isolation in *Mus musculus*. *Evolution*, 51, s. 2000–2005.
- Leinders-Zufall, T. et al., 2004.** MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science*, 306, s. 1033–103.

- Lohner, S. et al., 2013.** Gender Differences in the long-chain polyunsaturated fatty acid status: Systematic Review of 51 publications. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 62, s. 98-112.
- Mant, J. et al., 2005.** Cuticular Hydrocarbons as Sex Pheromone of the Bee *Colletes cunicularis* and the Key to its Mimicry by the Sexually Deceptive Orchid, *Ophrys exaltata*. *Journal of Chemical Ecology*, 31 (8), s. 1765-1777.
- Matsunami, H. & Buck, L. B., 1997.** A Multigene Family Encoding a Diverse Array of Putative Pheromone Receptors in Mammals. *Cell*, 90, s. 775–784.
- Monteforte, R. et al., 2008.** Morphological and biochemical changes in the Harderian gland of hypothyroid rats. *Journal of Experimental Biology*, 211, s. 606-612.
- Mueller, A.P., Sato, K. & Glick, B., 1971.** The chicken lacrimal gland, gland of Harder, caecal tonsil, and accessory spleens as sources of antibody-producing cells. *Cellular immunology*, 2, s. 140–152.
- Munger, S. D., Leinders-Zufall, T. & Zufall, F., 2009.** Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annual Review of Physiology*, 71(1), s. 115–140.
- Mykutowycz, R. & Dudzinski, M. L., 1966.** A study of the weight of the odoriferous and other glands in relation to social status and degree of sexual activity in the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Wildlife Research*, 11(1), s. 31 – 47.
- Niethammer, J., 1969.** Eine artspezifische Schwanzdrüse der männlichen Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis* Melchior, 1834). *Bonn. Zool. Beitr.*, s. 30–37.
- Novotny, M. et al., 1999A.** A unique urinary constituent 6-hydroxy-6-methyl-3-pentadecanone, is a pheromone that accelerates puberty in female mice. *Chemistry & biology*, 6: 377-383.
- Novotny, M. et al., 1999B.** Positive identification of puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proceeding of Royal Society London B*, 266, s. 2017-2022.
- Ntambi, J. M. et al., 2002.** Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 99, s. 1148
- Ohinata, Y. et al., 2002.** Male-Enhanced Antigen-1 Gene Flanked by Two Overlapping Genes Is Expressed in Late Spermatogenesis, *Biology of Reproduction*, 67, s. 1824-1831.
- Payne, A.P., 1979.** The attractiveness of Harderian gland smears to sexually naive and experienced male golden hamsters. *Animal behaviour*, 27, s. 897–904.
- Parkes, A.S. & Bruce, H.M., 1961.** Olfactory stimuli in mammalian reproduction. *Science*, 134, s. 1049-1054.

- Penn, D. J. & Potts, W. K., 1998.** MHC-disassortative mating preferences reversed by cross-fostering. *Proceeding of Royal Society London B*, 265, s. 1299–1306.
- Pfaff D. & Pfaffmann, C.; 1969.** Behavioral and electrophysiological responses of male rats to female rat urine odors. Z knihy Carl Pfaffmann; 1969. Olfaction and Taste. Published by Rockefeller University Press.
- Quay, W.B., 1965.** Variation and taxonomic significance in the sebaceous caudal glands of pocket mice (Rodentia: Heteromyidae). *The Southwestern Naturalist*, 10, s. 282–287.
- Ralls, K., 1971.** Mammalian scent marking. *Science*, 5, s. 443–449.
- Rammensee, H. G. et al., 1993.** MHC class I – restricted antigen processing – lessons from natural ligands. *Chem. Immunol*, 57, s. 113–133.
- Rodriguez, I. & Mombaerts, P., 2002.** Novel human vomeronasal receptor-like genes reveal species-specific families. *Current biology*, 12, s. R409–R411
- Sakai, T. & Yohro, T., 1981.** A histological study of the Harderian gland of Mongolian gerbils, *Meriones meridianus*. *The Anatomical Record*, 200, s. 259–270.
- Seyama, Y. et al., 1992.** Lipids in Harderian Glands and Their Significance. *Harderian Glands*, s. 195–217.
- Shaw, P. H. et al., 1983.** The gene for major proteins – expression in several secretory – tissues of the mouse. *Cell*, 32, s. 755–761.
- Schiestl, F. P. et al., 2000.** Sex pheromone mimicry in the early spider orchids (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *Journal of Comparative Physiology A*, 186 (6), s. 567–574.
- Schneider, M. R., Schmidt-Ullrich, R., Paus, R., 2009.** The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Current Biology*, 19, s. R132–R142.
- Schutze-Westrum, Thomas G., 1969.** Social communication by chemical signals in Flying Phalangids. Z knihy Carl Pfaffmann, 1969. Olfaction and Taste. Published by Rockefeller University Press.
- Singh, P. B. et al., 1987.** MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature*, 327, s. 161–164.
- Smith, K.R. & Thiboutot, D. M., 2008.** Thematic review series: Skin Lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *Journal of lipid research*, 49, 271–281.
- Stoddart, D. M., 1971.** An Examination of the Caudal Organ of *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. microps*, and *A. sylvaticus*, from Moravia (ČSSR). *Zoologické listy*, 21(1), s. 39–42
- Stoddart, D.M., 1977** cit. podle **Stoddart, D. M. & Sales, G. D., 1985.** The olfactory and acoustic biology of wood mouse, yellow-necked mice and bank voles. *Symposia of the Zoological Society of London*, 55, s. 177–39.

- Stoddart, D. M. & Sales, G. D., 1985.** The olfactory and acoustic biology of wood mouse, yellow-necked mice and bank voles. *Symposia of the Zoological Society of London*, 55, s.177-39.
- Stopka, P. & Macdonald, D. W., 1998.** Signal interchange during mating in the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*): The concept of active and passive signaling. *Behaviour*, 135, s. 231–249.
- Stopka, P. & Macdonald, D. W., 1999.** The Market Effect in the Wood Mouse, *Apodemus sylvaticus*: Selling Information on Reproduction Status. *Ethology*, 105, s. 969–982.
- Stopka, P. & Macdonald, D. W., 2003.** Way-marking behaviour: an aid to spatial navigation in the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). *BMC ecology*, 3, s. 3.
- Stopka, P., Janotová, K. & Heyrovský, D., 2007.** The advertisement role of major urinary proteins in mice. *Physiology & Behavior*, 91, s. 667–670.
- Stowe, M. K., Tumlinson, J. H. & Heath, R., 1987.** Chemical mimicry: Bolas Spiders Emit Components of Moth Prey Species Sex Pheromones. *Science*, Volume 236, Pages 964-967.
- Stubbe, M., 1971.** Die analen Markierungsorgane des Dachses (*Meles meles*). *Zool. Garten* 40, s. 125–135.
- Sugawara, T. et al., 2012.** Reduced size of sebaceous gland and altered sebum lipid composition in mice lacking fatty acid binding protein 5 gene. *Experimental Dermatology*, 21, s. 543–546.
- Suchomelová, E. & Frynta, D., 2000.** Intraspecific behavioural interactions in *Apodemus microps* a peaceful mouse? *Acta Theriologica* , 45 (2), s. 201–209.
- Tan, N. et al., 2002.** Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 22, s. 5114-5127
- Tew, T. E. & Macdonald, D. W., 1994.** Dynamics of space use and male vigour amongst wood mice, *Apodemus sylvaticus*, in the cereal ecosystem. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34, s. 337-345.
- Thiessen, D. D., 1988.** Body temperature and grooming in the Mongolian gerbil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 529, s. 27-30.
- Touhara, K. & Vosshall, L. B., 2009.** Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors. *Annual Review of Physiology*, 71(1), s. 307–332.
- Trinh, K. & Storm, D. R., 2003.** Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nature neuroscience*, 6, s. 519–525.
- Van der Lee, S. & Boot, L.M. 1955.** Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta physiologica et pharmacologica Neerl.*,4(3), s. 442-444.

- Vandenbergh, J. G., 1973.** Acceleration and inhibition of puberty in female mice by pheromones. *Journal of Reproduction and Fertility*, 19, s. 411-419.
- Veyrac, A. et al., 2011.** The main and accessory olfactory systems of female mice are activated differentially by dominant versus subordinate male urinary odors. *Brain Research*, 1402, s. 20–29.
- Weiler, E., 2005.** Postnatal development of the rat vomeronasal organ. *Chemical senses*, 30, s. i127–i128.
- Whitten, W.K., 1956.** Modification of the oestrus cycle of the mouse by external stimuli associated with male. *Journal of Endocrinology*, 13, s. 399-404.
- Wyatt, T. D., 2003.** Pheromones and Animal Behaviour (Communication by Smell and Taste). Printed by Cambridge University, United Kingdom.
- Zou, Z. & Buck, L. B., 2006.** Combinatorial effects of odorant mixtures in olfactory cortex. *Science*, 329, s. 1477–1481.